

ANNÉE 1968

11 U

Contribution à l'Étude Critique et Expérimentale
du Devenir Enzymatique de "Saccharomyces Cerevisiae"
au cours de la Lyophilisation

par

Marie-France VEDRINE née DUFOUR

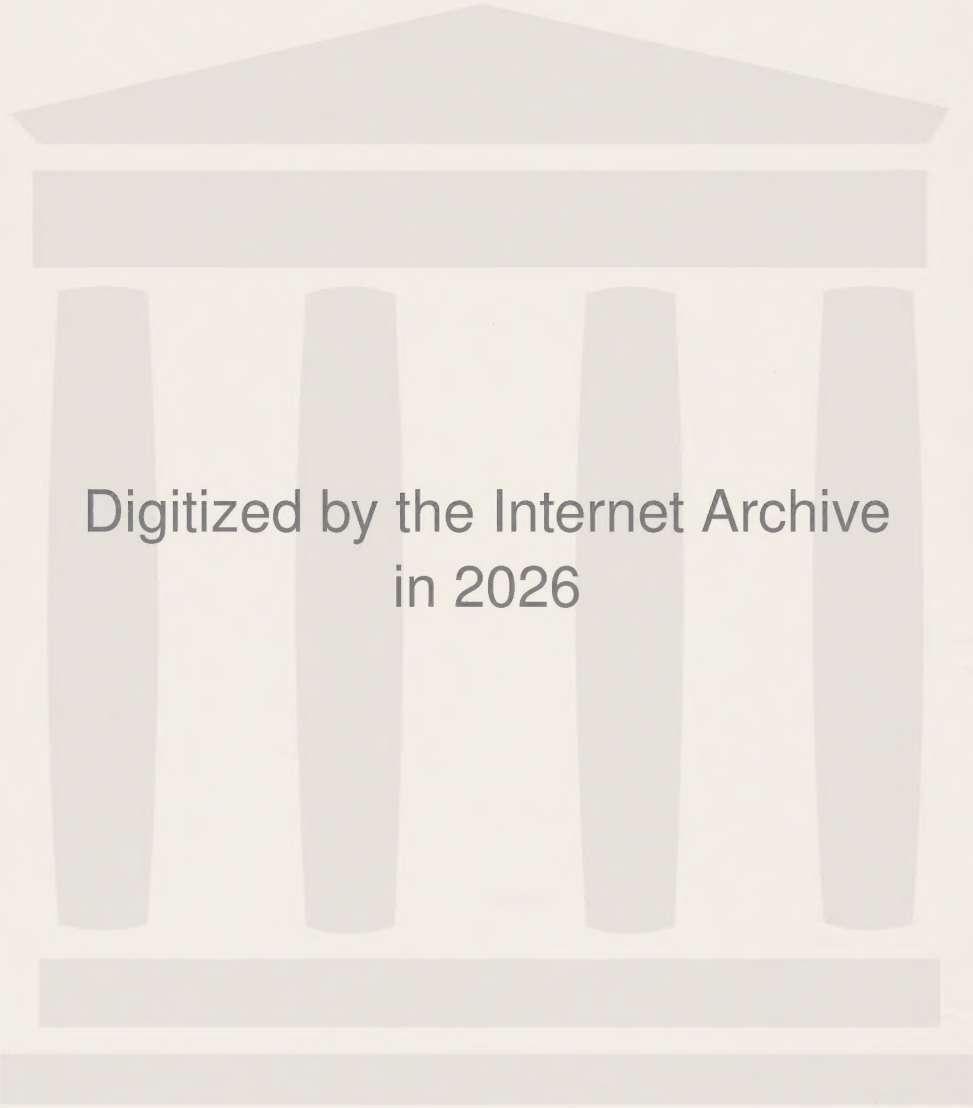
Docteur en Pharmacie

Assistant de Faculté

Président : M. DASTUGUE, Professeur

Membres du Jury : M. BASTIDE, Professeur

M. TRONCHE, Professeur



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546617_0022

ANNÉE 1968

**Contribution à l'Étude Critique et Expérimentale
du Devenir Enzymatique de "Saccharomyces Cerevisiae"
au cours de la Lyophilisation**

par

Marie-France VEDRINE née DUFOUR

Docteur en Pharmacie

Assistant de Faculté

Président : M. DASTUGUE, Professeur

Membres du Jury : M. BASTIDE, Professeur

M. TRONCHE, Professeur

UNIVERSITE DE CLERMONT

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Doyen : G. MEYNIEL
Assesseur : M. COULET

Doyen Honoraire : M. CUVELIER
Directeur Honoraire : M. MERLE
Professeurs Honoraires : Mme BLANQUET
MM. BUREAU, FOURNIER, GAUTHIER, POMME

I. Professeurs titulaires

MM. BARRIER	Clinique Chirurgicale A.
BASTIDE	Chimie Biologique et Pharmacodynamie
BAUDON	Clinique Obstétricale
BERGER	Chimie Analytique
BERGERON	Pathologie Médicale
COULET	Botanique et Microbiologie
CUVELIER	Hydrologie et Climatologie
DASTUGUE	Biochimie Médicale
DAUPHIN	Chimie Pharmaceutique et Toxicologie
DELAGE	Anatomie Pathologique
FEBVRE	Pharmacie Galénique
GRAS	Clinique Médicale
JACQUEMET	Technique Chirurgicale
JALLUT	Séméiologie Médicale
LATAIX	Pathologie Chirurgicale
MERCIER	Anatomie
MEYNIEL	Biophysique Médicale
MOLINA	Clinique Pneumo-phtysiologique
PETIT	Médecine Légale et Médecine Sociale
POROT	Clinique Neurologique et Psychiatrique
POURRAT	Matière Médicale
M ^{le} RAMPON	Thérapeutique
MM. ROUHER	Clinique Ophtalmologique
TERRASSE	Clinique Médicale
THIEBLot	Physiologie
THOMAS	Clinique Oto-rhino-laryngologique
TRONCHE	Pharmacie Chimique
TURCHINI	Histologie et Embryologie
VAURS	Bactériologie et Hygiène
WILLEMIN-CLOG	Clinique Médicale Infantile

II. Professeur titulaire à titre personnel

M. VIALLET

Electro-radiologie

III - Professeurs sans Chaire

MM. ALFIERI	Biophysique Médicale
CHAMPEIX	Médecine Légale et Médecine du Travail
CLUZEL	Bactériologie
DUCHENE-MARULLAZ	Physiologie
GERMAIN	Clinique Chirurgicale B

IV - Maîtres de Conférences Agrégés

M. BOSSY	Anatomie
Mle CHATONIER	Chimie Minérale et Minéralogie
Mme GAILLARD	Physique Pharmaceutique
M. MENUT	Pédiatrie et Puériculture
Mme MOINADE	Médecine Générale et Thérapeutique
M. PIGNIDE	Médecine Générale
Mme POURRAT	Botanique
M. VENRIES de LAGUILLAUMIE	Anatomie Pathologique

V - Agrégés

MM. FOURRIER	Orthopédie
HOUDARD	Chirurgie Générale
JANNY	Neuro-Chirurgie
RENARD	Pneumo-Phtisiologie
TOURNILHAC	Neurologie et Psychiatrie

VI - Délégués dans les fonctions de Maîtres de Conférences

MM. MALET	Histologie et Embryologie
MARCHEIX	Médecine Générale et Thérapeutique
PLAGNE	Cancérologie

Attaché Principal : M. BERTHON
Conservateur de la Bibliothèque : M. ARCHIMBAUD

La Faculté décide que les opinions émises dans les travaux et mémoires présentés à l'occasion d'une soutenance de thèse de Doctorat en Médecine ou en Pharmacie doivent être considérés comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner, ni approbation ni improbation. (Délibération en date du 6 juin 1956).

A MES PARENTS,

Qu'ils veuillent bien trouver ici le
témoignage de ma profonde affection
et de ma vive reconnaissance.

A MON MARI,

A MA FILLE Nathalie,

A MON FRERE le DOCTEUR Jean DUFOUR et à sa famille,

A MES BEAUX-PARENTS,

A MA FAMILLE,

A TOUS MES AMIS.

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur DASTUGUE

Professeur de Biochimie Médicale
Docteur en Médecine et en Pharmacie
Docteur ès Sciences
Lauréat de l'Académie de Médecine et de
l'Académie des Sciences
Chevalier de la Légion d'Honneur
Commandeur de la Santé Publique
Officier des Palmes Académiques
Officier de l'Ordre National du Mérite

Pour le grand honneur qu'il nous a fait
en acceptant la présidence de cette thèse,
après nous en avoir inspiré le thème et
en avoir guidé l'exécution de ses conseils
éclairés.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expres-
sion de notre respectueuse gratitude.

A NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le Professeur Pierre BASTIDE

Professeur de Chimie Biologique
et de Pharmacodynamie
Pharmacien Chef des Hôpitaux
Chevalier des Palmes Académiques

Monsieur le Professeur Pierre TRONCHE

Professeur de Pharmacie Chimique
Diplômé d'E.S. d'Ophtalmologie
Chevalier des Palmes Académiques

Qui nous ont fait l'honneur de juger cette
thèse en témoignage de gratitude et de pro-
fond respect.

I N T R O D U C T I O N

Au moment où un nouvel aspect des études enzymologiques, l'enzymopharmacologie, terme créé par nos Maîtres DASTUGUE et BASTIDE en 1962 (48), prenait de plus en plus d'extension, il était normal de penser au mode de préparation des enzymes sous leurs différentes présentations pharmaceutiques et devant l'apparition d'un nombre toujours plus grand de diastases sous forme lyophilisée, de déterminer l'influence de la lyophilisation sur les divers systèmes enzymatiques.

Tout cela conduisit notre Maître, Monsieur le Professeur DASTUGUE, à nous confier l'étude du devenir enzymatique au cours de la cryodessiccation, en se penchant plus particulièrement sur l'équipement fermentaire des levures "Saccharomyces Cerevisiae" aux différentes étapes de leur fabrication.

Notre travail se divisera en deux parties :

- Une première partie bibliographique dans laquelle, après un bref rappel de généralités sur les levures, leur composition chimique et plus spécialement leur équipement enzymatique, nous aborderons le problème de la lyophilisation, son influence sur les levures, sur les protéines et enfin sur les systèmes enzymatiques puisqu'est là le véritable but de nos recherches.

- Une deuxième partie expérimentale illustrera la bibliographie puisque nous examinerons successivement, aux différents stades de la lyophilisation, les activités enzymatiques suivantes : aminotransférasiques, phosphatasique acide, β h fructofuranosidasique, leucine amino peptidasique, fructose I-6 diphosphoaldolasique et glucose phosphate isomérasique.

Nous compléterons notre étude par un dosage de l'azote total et un dosage des acides ribonucléique et désoxyribonucléique aux différents stades de la lyophilisation. Afin de faciliter l'interprétation de nos résultats, il nous a paru bon, enfin, de donner un essai d'interprétation et discussion ainsi que le résumé et les conclusions générales auxquelles nous avons abouti.

Nous tenons à exprimer tous nos remerciements aux Laboratoires BIOCODEX et en particulier à Mademoiselle LAVIGNE, pharmacien, qui ont eu l'extrême obligeance de nous confier les substances étudiées aux différentes étapes de leur fabrication.

Nous ne saurions terminer cette introduction sans exprimer notre vive gratitude à notre Maître, Monsieur le Professeur DASTUGUE qui nous a admis comme assistant dans son laboratoire, a inspiré le sujet de cette thèse et en a guidé la réalisation de ses conseils éclairés.

Que Monsieur le Professeur BASTIDE, dont l'amabilité et les profondes connaissances scientifiques nous ont été précieuses, trouve ici l'expression de nos plus vifs remerciements.

Nous assurons Monsieur le Professeur TRONCHE de notre respectueuse gratitude pour avoir bien voulu faire partie de notre Jury de Thèse.

Nous tenons également à marquer notre reconnaissance à Monsieur ARCHIMBAUD, Conservateur à la Bibliothèque de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie, qui a facilité nos recherches bibliographiques ainsi qu'à tous nos Maîtres de cette Faculté pour la qualité de l'enseignement qu'ils nous ont prodigué.

P R E M I E R E P A R T I E

RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES

C H A P I T R E I

GENERALITES SUR LA LYOPHILISATION

LA LYOPHILISATION -

Lorsque commença à se poser de façon scientifique le problème de la conservation des produits biologiques, de nombreuses méthodes furent proposées mais fort peu s'avérèrent parfaitement satisfaisantes.

Si on fait appel à la stérilisation par la chaleur, on s'aperçoit rapidement qu'elle détruit la plupart des micro-organismes, supprime toute activité enzymatique et provoque une dénaturation importante des molécules protéiques.

La congélation seule n'est pas suffisante car bien qu'elle respecte la structure des protéines présentes dans le milieu et ne fasse que stopper les phénomènes enzymatiques, elle ne permet pas la conservation du produit ramené à la température de la pièce, mais nécessite le maintien de cette même congélation.

C'est pourquoi les recherches continuèrent dans ce sens et deux savants français, BORDAS et d'ARSONVAL furent les premiers en 1919 (29) à appliquer le principe de la "sublimation de la glace dans le vide" à la dessiccation des sérums et des vaccins avec conservation des propriétés immunologiques. La précision des modalités techniques n'apparut qu'en 1935-1939. En Angleterre et aux Etats-Unis, le procédé subit un développement considérable dû aux besoins intensifs des armées en plasma desséché. Un rapport spécial du "Medical Research Council" (1946) vint résumer les travaux qui avaient permis la préparation de ce plasma. Le premier symposium international sur la congélation et la dessiccation a été tenu à Londres en 1951 et fut suivi par un deuxième en 1958 puis par un troisième en 1959.

C'est à la huitième édition (1965) du CODEX (40) que l'on doit la définition la plus satisfaisante de la lyophilisation comme "technique

de dessiccation par sublimation de la glace de solutions, de tissus animaux ou végétaux préalablement solidifiés par congélation". Cette opération laisse un produit sec de constitution spongieuse particulièrement apte à la réhydratation ou à la dissolution comme le souligne le qualificatif "lyophile". En utilisant les basses températures, on peut penser trouver une méthode de stabilisation et l'élimination totale de l'eau contenue dans le spécimen semble être la meilleure solution. On a recours à la cryo-dessiccation qui consiste à déshydrater sous vide un produit congelé. Son but est de conserver l'intégrité biochimique et structurale des produits instables.

Pour comprendre comment la lyophilisation peut agir sur les produits biologiques, nous envisagerons successivement ses différentes étapes : congélation puis dessiccation des produits congelés par sublimation de la glace à basse température et sous pression réduite.

La congélation, tout d'abord, intéressa de nombreux auteurs français et étrangers, nous ne pouvons ici en citer que quelques-uns.

Il est connu, depuis fort longtemps, nous indique REY (1957) (240), préoccupé tout particulièrement par ce problème, que le froid conserve un grand nombre de produits altérables. L'auteur précise que les températures finales les plus utilisées vont de -80° (glace carbonique) à -193° (azote liquide). En effet, les basses températures sont favorables selon LOVELOCK (1957) (159) à la préservation des substances sensibles ou instables comme les protéines et les enzymes.

La congélation, pour BERGER (1957) (21) respecte sensiblement la structure des protéines présentes dans le milieu et stoppe momentanément le développement des micro-organismes (sans les détruire) ainsi que les autres phénomènes cliniques ou enzymatiques.

Le froid n'a pas d'action nocive sur le produit congelé selon MERYMAN, 1960 (182) et le déséquilibre métabolique, pouvant se produire, est réversible s'il n'est pas trop étendu.

Considérant le problème de la survie, TAYLOR (1960) (288) indique que ce sont des suspensions de cellules refroidies à -78° ou à -120° qui donnent la proportion la plus élevée de survies des organismes après congélation. La plupart des lésions apparaissent au voisinage de -20° .

Dans le même sens, une étude fut faite par LOVE en 1962 (156) : des coupes de morues congelées, desséchées sous vide à -29° et enveloppées dans de la paraffine furent examinées pour déterminer la formation de cristaux de glace et ainsi la dénaturation pouvant apparaître à la congélation. Le taux de dénaturation n'augmente pas continuellement : après un certain temps, le taux diminue apparemment par augmentation de la proportion de glace par rapport à l'eau libre. MERYMAN en 1956 (181) et bien avant LUYET et GEHENIO en 1940 (165) avaient mis en évidence le dommage causé aux cellules par le développement des cristaux de glace.

La transformation de l'eau de constitution en glace, pour accroître la stabilité des produits naturels, ne va pas sans quelques perturbations. C'est pourquoi on a essayé de réaliser les conditions les meilleures pour éviter ces incidents en examinant les différents problèmes résultant de la congélation.

Il n'est pas question de faire ici un exposé technique de la congélation mais nous voudrions seulement aborder quelques points qui nous ont paru intéressants.

Il faut d'abord préciser ce que l'on entend par transformation de l'eau de constitution car, en effet, on peut distinguer l'eau dite libre qui peut être extraite sans dénaturation de l'eau liée dont le retrait risque d'entraîner des phénomènes d'altérations irréversibles.

Considérons l'importance de la vitesse de congélation et, de ce fait, celle de la cristallisation.

La première proposition d'un refroidissement ultra rapide fut faite par LUYET et Coll. en 1940 (165). La vitesse de refroidissement d'un tissu doit être telle qu'aucune évolution ne puisse se produire ; l'eau n'aura pas le temps de cristalliser et donnera directement une structure vitreuse. C'est en 1951 que LUYET (163) se rend compte du rôle de la "vitrification" : si on refroidit lentement une solution de saccharose à 50 %, on obtient la formation de cristaux de glace, si au contraire on réalise un film mince sur lamelle de verre que l'on plonge dans l'air liquide, il y a vitrification. Et, si on peut éviter la formation de cristaux, par congélation et dégel ultra rapide, on peut conserver sans altération.

LOSSOUARN (153) et MANGEOT, 1954 (169) sont en accord pour confirmer que la lyophilisation doit être aussi rapide que possible pour bloquer ou figer les molécules de produits qui subiront ainsi le minimum de risques de coagulation.

Au cours d'une congélation lente et d'une décongélation lente, il apparaît une rupture des équilibres biochimiques. Deux théories, selon REY, 1957, peuvent être opposées (241).

- Il est nécessaire de produire une lente congélation pour prolonger la période d'adaptation de la cellule aux conditions de son nouveau milieu.

- Il est préférable de produire une rapide congélation pour éviter cette période de déséquilibre interne et pour bloquer tous les métabolismes.

Il semble bien que ce soit la deuxième hypothèse qui réunisse le plus grand nombre de suffrages.

Les raisons de la nécessité de cette rapide congélation nous furent fournies par BERGER, 1957 (21), les molécules fragiles comme les protéines, dispersées dans le solvant, doivent être figées sur place et conserver la même dispersion qu'en milieu liquide. La rapidité est le facteur essentiel de la congélation ; on évite ainsi des concentrations salines partielles susceptibles d'altérer les propriétés physico-chimiques des substances dissoutes. L'avantage d'une congélation rapide est d'engendrer des cristaux extrêmement fins présentant une surface d'évaporation considérable, ce qui facilite la sublimation ultérieure du produit.

En ce qui concerne les tissus animaux et végétaux, une fine cristallisation évite l'éclatement des fibres, la déchirure des parois cellulaires et la dénaturation des protéines constitutives.

La grosseur des cristaux qui apparaissent à la congélation peut lacérer et même rompre les membranes cytoplasmiques (TAYLOR, 1957) (287).

Ainsi, la même année, SUMMERS (277) suggère d'éviter la formation de gros cristaux engendrés par une congélation lente qui, non seulement briseraient les parois des cellules, mais provoqueraient même un exsudat à la décongélation.

L'effet d'une congélation lente sur la crème blanche fut étudié par COLE et Coll., en 1959 (41) ; le résultat est le rassemblement des globules gras qui apparaîtront altérés à la décongélation alors qu'une congélation plus rapide distribue les globules de façon beaucoup plus égale.

LEVITT en 1960 (144), reprenant les hypothèses de NEI et Coll. (1954) (202) et SHERMAN (1957) (263) affirme qu'une lente congélation des tissus et suspensions cellulaires provoque généralement la formation de larges cristaux localisés entièrement dans les espaces extracellulaires. Alors qu'une rapide congélation donne de petits cristaux localisés uniformément partout dans le spécimen, selon l'avis de MERYMAN (1956) (181) et MAZUR, 1960 (175) qui précisent la diminution de la dislocation de l'eau et la ressemblance beaucoup plus accentuée entre les cellules originales non congelées et celles congelées de façon très rapide.

Des précisions supplémentaires furent apportées par REY en 1960 (242) sur la taille des cristaux qui dépend essentiellement de la vitesse de congélation. Au cours d'une congélation lente, peu de centres cristallins se forment, les cristaux sont très gros et irréguliers alors que, si la congélation est brusque, les germes sont très nombreux. Donc, en conclusion, lorsque la congélation a lieu très rapidement et à très basse température, il n'y a pas cristallisation et l'eau donne naissance à une forme solide cryptocristalline : c'est la vitrification qui constitue les meilleures conditions d'une bonne lyophilisation. La congélation ultra rapide cause moins de dommage aux cellules que la congélation lente. Cette observation de LUYET, 1962 (164) est basée sur le fait que le dommage provient de la formation de cristaux d'un volume plus grand que l'eau précédente et un tel dommage n'apparaît pas quand l'eau est vitrifiée par un refroidissement ultra rapide.

PEUZIAT, en 1966 (227) compléta les hypothèses précédentes. Le "quick-freezing" des auteurs anglo-saxons saisit les liquides organiques sans que les textures des cellules individuelles soient modifiées ou désagrégées et sans échanges osmotiques entre les parois cellulaires. La cristallisation est instantanée, les cristaux de glace sont très petits et l'eau qu'ils fournissent après fusion peut s'incorporer à nouveau dans le suc protoplasmique.

Le deuxième point que nous voudrions approfondir est celui des substances protectrices. On savait depuis fort longtemps que la cryoprécipitation des protéines pouvait être prévenue par addition de sucre, LIDFORSS (1907) (148). C'est au biologiste J. ROSTAND (251) que revient le mérite d'avoir découvert en 1946 le rôle protecteur du glycérol. PARKES (218) fit des réserves en précisant que l'emploi du glycérol dans la technique de congélation est décevant car il ne fait que se concentrer et ne distille pas pendant la sublimation. En cherchant un substituant qui puisse

être volatil et ne pas se concentrer, l'auteur s'est arrêté à l'alcool méthylique sans toutefois d'expérience prometteuse .

L'addition de colloïdes protecteurs (substances protéiques aux gommes) selon LOSSOUARN, 1954 (153) donne aux cultures un pourcentage plus important de germes vivants que sans protecteur . Pour diminuer les pertes pendant la lyophilisation des solutions d'albumine de plasma, de produits pharmaceutiques, l'adjonction de gélatine, en quantité inférieure à 0,01 pour 100 par exemple, est recommandée par NEUMANN en 1957 (205).

REY (1957) (240) attire à nouveau l'attention sur l'effet du glycérol, non toxique pour la cellule et dont il indique le mécanisme d'action : le glycérol évite les effets nocifs des hautes concentrations salines en agissant comme diluant, il diminue la température et la vitesse de cristallisation, facilite la formation de structure vitreuse et régularise la formation des mélanges eutectiques ; son rôle prédominant est certainement dans la stabilisation des systèmes enzymatiques et dans la régularisation de l'arrêt et de la reprise de l'activité physiologique.

Cet effet protecteur fut confirmé par ANDJUS en 1960 (4). Le taux de dénaturation est réduit, selon LOVE (1962) (156) par traitement au glycérol, probablement par action du glycérol sur la formation de la glace. L'addition de 10 pour 100 de glycérol ou de certains sels de Mg ou de Ca améliore le taux de survie d'Aspergillus Orizae et augmente même l'activité enzymatique de l'amylase tandis que les sels de Fe, Cu et Hg ont un effet opposé (AMADO, 1963) (2).

En 1960, POLDGE et Coll. (231) et PARKES (218) ont employé le méthanol qui offre une excellente protection pour le sang et le tissu ovarien. Toutefois, il devient toxique à des températures de -30°C - 40°C par un phénomène de cryoconcentration. Le diméthyl sulfoxyde est au moins égal et dans certaines conditions, supérieur au glycérol pour la protection des cellules contre la congélation. (GREIFF et Coll., 1961) (98). Travaillant sur les érythrocytes humains soumis à la congélation à -40° , NASH, en 1961 (199) a affirmé l'effet protecteur des solutions de N oxyde de pyridine. Cette action se traduit par une réduction de l'hémolyse ; l'auteur confirme en 1962 (200) l'activité des simples glycols qui protègent les cellules vivantes du dommage mortel causé par congélation à basse température. En 1963, MOORICHI et Coll. (192) avaient précisé que l'acide glutamique donnait une considérable survie de vingt et une espèces bactériennes lyophilisées. Parmi les produits ayant une valeur protectrice équivalente sur les Gram + ou -, citons l'acide aspartique, les acides cystéique et malonique. L'arginine possède également un effet protecteur plus important sur les Gram + que sur les Gram -, selon MORICHI et Coll. 1965 (193). Enfin, il est connu depuis longtemps que les enzymes sont stabilisés par addition de substrat, nous rappelle DIXON en 1964 (62).

La deuxième étape de la lyophilisation est la dessiccation du produit congelé. Nous ne saurions ici entrer dans des détails techniques mais nous voudrions simplement préciser en premier lieu l'importance du milieu de dessiccation.

En 1949, FRY et GREAVES (81) suggérèrent un milieu contenant 75 pour 100 de sérum et 25 pour 100 de bouillon glucosé (7,5 g de glucose pour 100 ml donnant satisfaction pour un certain nombre d'organismes parmi lesquels Nesseria Gonorrhoe et Vibrio Cholerae particulièrement délicats, à la

fois immédiatement après et au bout d'un long temps de conservation à la température de la pièce. A ce moment, ils indiquent que le sérum agit comme colloïde protecteur et comme support du milieu pour donner une masse compacte desséchée et que le glucose sert de tampon pour maintenir une certaine humidité qui empêche les organismes de devenir trop secs ; l'effet du glucose est partagé par d'autres sucres : lactose et saccharose. Mais il faut bien avouer que ce milieu n'est pas approprié pour l'injection humaine de vaccin vivant.

FRY fit un bilan de nos connaissances jusqu'en 1954 (80) : le facteur le plus important pour le pourcentage de survivants à la fois immédiatement après dessiccation et après une longue conservation est sans aucun doute le milieu dans lequel sont unis les organismes pour la dessiccation. De nombreux milieux ont été essayés comme le sérum, le bouillon, le lait écrémé et la gélatine mais rarement le succès a été vérifié par recensement des survivants sur des variétés d'organismes. L'utilisation du glutamate de sodium dans le milieu, selon OBAYASHI (1960) (211) augmente la stabilité du B.C.G. MUGGLETON, 1960 (195) ajoute à ce milieu un mélange de 5 pour cent de glucose et de 5 pour cent de saccharose. D'autres auteurs, comme MEANWHILE et SCOTT (1962) (177) dessèchent leur culture dans un bouillon de papaïne digérée.

Enfin, le problème de la dessiccation fut abordé par GREAVES en 1962 (94) ; il a introduit une méthode empirique de chauffage dans laquelle le matériel desséché est soumis à une température de 100° ; la dessiccation doit être aussi rapide que possible et à des températures compatibles avec l'obtention d'un produit acceptable.

En effet, le deuxième paramètre qui entre en jeu est la température car il est nécessaire d'opérer à une température suffisamment haute pour que l'opération s'accomplisse en un temps raisonnable en restant toutefois à une température inférieure à la zone eutectique. REY, en 1957 (241) notait que la température ne devait pas s'élever au-dessus de celle des mélanges eutectiques. Les conditions de la dessiccation devront assurer un heureux équilibre entre la température et le vide. Il est nécessaire que la température soit suffisamment basse pour prévenir toute altération et suffisamment haute pour que la glace se sublime à une température raisonnable. La température doit être inférieure à - 20°, - 30°C suivant la position du point eutectique, (NEUMAN, 1960) (206). Le fait de tolérer les basses températures de congélation va de pair, selon ANDJUS (1960) (4) avec celui de supporter une forte dessiccation ; la formation de glace intercellulaire est équivalente au dessèchement.

Une comparaison intéressante fut établie par RICHARDSON et Coll., en 1959 (246) entre les effets de la congélation et ceux de la lyophilisation sur l'activité des cultures de Streptococcus lactis. La congélation, seule, ne réduit pas l'activité de la culture, mais la lyophilisation la fait passer de 0,44 à 0,41. Après conservation de trois à six mois, l'activité de la culture cryodesséchée est de 0,37 et 0,34 et congelée 0,31 et 0,25.

Cette technique, outre l'élimination presque parfaite de tous les facteurs d'altération, permet également une fine cristallisation des cellules et des tissus animaux, le respect absolu des fibres tissulaires et des parois cellulaires et la conservation intégrale consécutive des protéines.

Son intérêt est objectivé par la protection contre l'action oxydante de l'air, l'action hydrolysante de l'eau, l'action de surface dénaturante (bouillonnement, moussage), la concentration du liquide (dénaturation des protéines), la croissance bactériologique, les modifications enzymatiques et la dénaturation physicochimique des molécules fragiles.

Durant les dernières années de guerre, la technique de lyophilisation a été utilisée de plus en plus fréquemment dans les domaines industriels, alimentaires et pharmaceutiques.

Actuellement, on peut envisager un très grand éventail d'applications :

- Dans le domaine biochimique : en vue de l'isolement ou du dosage de certaines substances altérables irréversiblement par la chaleur : protéines, enzymes et hormones de nature protéique, vitamines.

- Pour la préparation de réactifs biochimiques, tels qu'uréase, tromboplastine, alexine, protéines diverses de références: albumine, globuline.

- Dans le domaine biologique : BERGER (1957) (21) rapportant les travaux de HARRIS, de FRY et de HAUDUROY indique que toutes les cultures et presque toutes les variétés microbiennes peuvent être lyophilisées. Si un assez fort pourcentage d'éléments microbiens est en fait détruit par dessiccation, il reste une proportion suffisante de micro-organismes pour conserver aux cultures leurs morphologies et leur virulence. On peut, ainsi, lyophiliser microbes, virus, levures, spores, graines...

- Dans le domaine industriel enfin, nous citerons seulement les principaux produits, sang, lait, produits pharmaceutiques divers, antibiotiques, greffons d'organes...

Nous venons d'essayer d'examiner dans son ensemble le problème de la lyophilisation. Si nous devions ici conclure nous pourrions dire que si les conditions suivantes : basse température et rapidité de la congélation, présence de protecteurs et température et milieu de dessiccation déterminés, sont respectés, on peut espérer éliminer les facteurs d'altération et de dénaturation intervenant à des degrés divers dans les autres méthodes de dessiccation et, de ce fait, on peut préconiser ce procédé pour une bonne préparation.

C H A P I T R E I I

LES LEVURES ET LEUR LYOPHILISATION

I - GENERALITES

Les levures sont universellement connues comme agent de la fermentation alcoolique et de la fermentation panairè. Les botanistes ont essayé de donner une définition moderne du terme de levure : "Ce sont des champignons dont la forme de croissance est le plus généralement unicellulaire" (SKINNER) (270). Pour le Codex (40), la levure officinale est constituée par une levure de fermentation haute ou basse, préalablement lavée à l'eau puis pressée et desséchée à température inférieure à 40°C.

Dans la dernière classification de LODDER et Coll. de 1958 (151), on relève :

SACCHAROMYCES CEREVISIAE

- Genre : Saccharomyces
- Tribu : Saccharomyceteae
- Sous famille : Saccharomycetoideae
- Famille : Saccharomycetaceae Ascomycète

Ce sont des levures ascoporées, bourgeonnantes, se présentant sous forme de cellules, le plus souvent ovales, comprenant une membrane cellulosique, un protoplasme et un noyau.

Saccharomyces cerevisiae boulardii est une espèce utilisée comme levure de boulangerie, de brasserie ou de vin, dans la préparation de l'alcool, dans d'autres fermentations secondaires et employée en pharmacie et en diététique. Cette levure isolée en Indochine et sélectionnée par BOULARD a un très bon développement à 37°.

II - COMPOSITION CHIMIQUE

Nous nous contenterons de donner un schéma dont on retrouvera tous les détails dans la thèse de Guy MARTIN, 1962 (170) :

- Humidité : 18 pour cent.
- Matières minérales : cendres : 5 à 9 pour cent.
- Glucides : 23 pour cent.
- Substances azotées : 53 pour cent.
- Lipides : 1 à 5 pour cent.
- Vitamines : groupe B, PP, FF, biotine, acide folique, vitamine C.
- Enzymes : nous allons donner un aperçu de l'équipement enzymatique des levures selon les "Recommandations of the International Union of Chemistry on the Nomenclature and Classification of Enzymes, de 1964"(73).

OXYDOREDUCTASES

Agissant sur les groupements CH-OH des donneurs I.I. :

- Avec NAD ou NADP comme accepteur I.I.I.
 - . Alcool déhydrogénase I.I.I.I.
 - . Lactate déhydrogénase I.I.I.27.
 - . Malate déhydrogénase I.I.I.37.
 - . Isocitrate déhydrogénase I.I.I.41.
 - . Glucose 6 phosphate déhydrogénase I.I.I.49.
- Avec oxygène comme accepteur I.I.3.
 - . Glucose oxydase I.I.3.4.

Agissant sur les groupements aldéhydrique ou cétonique des donneurs I.2. :

- Avec NAD ou NADP comme accepteur I.2.I.
 - . Aldéhyde déhydrogénase I.2.I.3.
 - . Triose phosphate déhydrogénase I.2.I.9.

Agissant sur le groupement CH-OH des donneurs I.3. :

- Avec d'autres accepteurs I.3.99.
 - . Succinate déhydrogénase I.3.99.I.

Agissant sur le groupement CH-NH₂ des donneurs I.4. :

- Avec NAD ou NADP comme accepteur I.4.I.
 - . Glutamate déhydrogénase I.4.I.2.

Agissant sur NAD réduit ou sur NADP comme donneur :

- Avec NAD ou NADP comme accepteur I.6.I.
- Avec cytochrome comme accepteur I.6.2.
 - . Cytochrome C DPN réductase I.6.2.3.
- Avec un disulfide comme accepteur I.6.4.
 - . Diaphorase I.6.4.3.
- Avec d'autres accepteurs I.6.99.
 - . NADPH2 oxydoreductase I.6.99.I.

Agissant sur les hèmes des donneurs I.9. :

- Avec oxygène comme accepteur I.9.3.
 - . Cytochrome oxydase I.9.3.I.

Agissant sur les diphénols comme donneurs I.10 :

- Avec oxygène comme accepteur I.10.3.
 - . O diphénol oxydase I.10.3.I.
 - . Acide ascorbique oxydase I.10.3.3.

Agissant sur les peroxydes d'hydrogène comme accepteurs I.11. :

- . Catalase I.11.1.6.
- . Peroxydase I.11.1.7.

TRANSFERASESTransférant le groupement C.2.1. :

- Méthyltransferases ou transméthylases 2.1.1.

Transférant les résidus aldehydiques ou cétoniques 2.2. :

- . Transcétolase 2.2.1.1.
- . Transaldolase 2.2.1.2.

Glycosyltransferases ou transglycosylases 2.4. :

- Hexosyl transferases 2.4.1.
 - . Glycogène phosphorylase 2.4.1.1.
- Pentosyltransferases 2.4.2.
 - . Purine nucleoside phosphorylase 2.4.2.1.

Transférant les groupements N 2.6. :

- Aminotransferases ou transaminases 2.6.1.
 - . Aspartate aminotransferase ou transaminase glutamique oxaloacétique 2.6.1.1.
 - . Alanine aminotransferase ou transaminase glutamique pyruvique 2.6.1.2.

Transférant les groupements avec P.2.7. :

- Phosphotransferases avec groupement alcool comme accepteur 2.7.1.
 - . Hexokinase 2.7.1.1.
 - . Phosphoglucokinase 2.7.1.10.
 - . Phosphofructokinase 2.7.1.11.
 - . Adenosine phosphokinase 2.7.1.20.
 - . Pyruvate kinase 2.7.1.40.
- Phosphotransferases avec un groupement P comme accepteur 2.7.4.
 - . Adenylate kinase 2.7.4.3.
 - . Nucleosidase kinase 2.7.4.6.
- Phosphotransferases avec régénération des donneurs 2.7.5.
 - . Phosphoglucomutase 2.7.1.5.
- Nucleotidyltransférases 2.7.7.
 - . Ribonuclease 2.7.7.16.

HYDROLASESAgissant sur les liaisons esters 3.1. :

- Hydrolases de monoesters phosphoriques 3.1.3.
 - . Phosphatase alcaline 3.1.3.1.
 - . Phosphatase acide 3.1.3.2.
 - . 5'nucleotidase 3.1.3.5. 3'nucleotidase 3.1.3.6.
- Hydrolases de diesters phosphoriques 3.1.4.
 - . Phosphodiesterase 3.1.4.1.
 - . Desoxyribonucléase 3.1.4.5.

Agissant sur les composés glycosyl 3.2. :

- Hydrolases de glycosides 3.2.1.
 - . α amylase 3.2.1.1.
 - . β amylase 3.2.1.2.
 - . α glucosidase 3.2.1.20.
 - . β glucosidase 3.2.1.21.
 - . α D galactosidase 3.2.1.21.
 - . manosidase 3.2.1.25.
 - . β h fructofuranosidase 3.2.1.26.
 - . Trehalase 3.2.1.28
- Hydrolases des composés N glycosyl 3.2.2.
 - . Uridine nucleosidase 3.2.2.3.

Agissant sur les liaisons peptidiques 3.4. :

- Hydrolase d' α amino peptides 3.4.1. : L.A.P.
- Hydrolase de peptidyl aminoacides 3.4.2.
 - . Yeast carboxypeptidase 3.4.2.3.
- Hydrolases de dipeptides 3.4.3.
- Hydrolases de peptidylpeptides 3.4.4.
 - . Pepsine (like) 3.4.4.1.
 - . Trypsine (like) 3.4.4.4.

Agissant sur les liaisons C-N, autres que les liaisons peptitiques 3.5. :

- Dans amides linéaires 3.5.1.
 - . Asparaginases 3.5.1.1.
- Dans les amidines linéaires 3.5.3.
 - . Arginase 3.5.3.1.
- Dans les amidines cycliques 3.5.4.
 - . Cytosine deaminase 3.5.4.1.
 - . Guanine deaminase 3.5.4.3.
 - . Cytidine deaminase 3.5.4.5.

Agissant sur les liaisons anhydrides d'acides 3.6. :

- Dans les anhydrides contenant des groupements phosphoryl 3.6.1.
 - . Pyrophosphatase 3.6.1.1.
 - . Polyphosphatase 3.6.1.10.

LYASESLyases carbone carbone 4.1. :

- Carboxylyase 4.1.1.
 - . Pyruvate décarboxylase 4.1.1.1.
 - . Oxaloacétique décarboxylase 4.1.1.3.
- Aldehydes lyases 4.1.2.
 - . Fructose diphosphate aldolase 4.1.2.13.

Lyases carbone oxygène 4.2. :

- Hydrolyases 4.2.1.
 - . Fumarate hydratase 4.2.1.2.
 - . Aconitase hydratase 4.2.1.3.
 - . Phosphopyruvate hydratase 4.2.1.11.

Lyases carbone azote 4.3. :

- Ammonium lyase 4.3.1.
 - . Aspartase 4.3.1.1.

ISOMERASESRacémases et épimérase 5.1. :

- Agissant sur les carbohydrates et dérivés 5.1.3.
 - . Galactowaldénase 5.1.3.2.

Oxydoréductases intramoléculaires 5.3. :

- Aldoses et cétoles 5.3.1.
 - . Phosphotriose isomérase 5.3.1.1.
 - . Phosphomannose isomérase 5.3.1.8.
 - . Glucose phosphate isomérase 5.3.1.9.

LIGASESFormant des liaisons C-N 6.3. :

- Amides synthétases 6.3.1.
 - . Glutamine synthétase 6.3.1.2.
- Peptides synthétases 6.3.2.
 - . Gluthation synthétase 6.3.2.3.

Toutes les diastases que nous venons de passer en revue ont été mises en évidence dans les levures par de nombreux auteurs et pour certaines d'entre elles, comme l'invertase ou la glucosidase, les levures constituent même une véritable source industrielle de production.

III - LYOPHILISATION DES LEVURES

Nous voudrions maintenant aborder le problème de la lyophilisation des levures. Nous examinerons successivement l'influence de la congélation, de la dessiccation et enfin de la cryodessiccation dans son ensemble. Nous adopterons le même plan pour toute la suite de ce travail.

La congélation est le premier obstacle que doit franchir la levure au cours de sa lyophilisation.

En milieu de culture congelée, vingt et une espèces de levures, selon SMART, 1935 (271), survivent et se multiplient pendant une année à 16°F (- 8,9°C). La raison de ce phénomène est la continuation de l'activité enzymatique bien qu'à un taux diminué quand le milieu est congelé.

L'étude de la survie des levures, à une rapide ou à une lente congélation, même en milieu aqueux, fut faite par LUYET en 1951 (163). Il est possible que la survie soit due à l'absence de glace à l'intérieur des organismes et cette déshydratation se fait par exomose, par formation de glace à l'extérieur de la cellule. Ajoutons que les basses températures, suivant BIJAK et Coll. (1957) (25), n'ont pas d'effet nuisible sur la qualité de la levure de boulangerie.

Ces micro-organismes à des températures inférieures à 0°C furent l'objet des importants travaux de MAZUR en 1960 (175). Pour mesurer la survie de Sacchamoryces cerevisiae, il étudia le pourcentage de survie des spores qui furent refroidies et lentement réchauffées dans un milieu de suspension (eau bidistillée) congelé ou non. Il arrive à la conclusion qu'un faible taux de mortalité apparaît en l'absence de congélation. La survie des levures reste à 100 pour 100 jusqu'à - 10°C puis tombe rapidement entre - 10° et - 25°C. A une température de - 30°, la plupart des effets nuisibles apparaissent pendant la première minute d'exposition avec une survie passant de 100 pour 100 à 1 pour 100. En conclusion, la survie, toujours selon MAZUR, dépend de la température de congélation, de la vitesse de congélation, de la vitesse du réchauffement et de la nature du milieu de suspension. MAZUR, en 1963 (176) indique qu'un refroidissement rapide à - 196° suivi par un réchauffement lent tue plus de 99,9 pour 100 des cellules de Saccaromyces cerevisiae, alors que ces mêmes cellules sont relativement insensibles à une congélation lente et à une décongélation rapide. L'auteur montre, en 1965, que la mort apparaît avec une cristallisation intracellulaire. A la décongélation, le liquide intracellulaire s'échappe de la cellule, ce qui prouve bien la lésion de la cellule et l'augmentation de la perméabilité de la membrane.

Poursuivant l'étude de la cryodessiccation, nous arrivons à la dessication. L'effet de la dessication sur l'activité de la levure de boulangerie fut remarqué par OYAAS et Coll. (1946) (216) ; quelle que soit l'importance du vide réalisé, la dessication réduit de moitié l'activité originelle de la levure, activité mesurée par le dégagement d'anhydride carbonique.

Pour une souche de collection de levure, la dessication dans le vide, selon DOPTER en 1948 (63), élimine les formes irrégulières mais entraîne la disparition de toute sporulation. DOPTER remarque certaines altérations morphologiques de Saccharomyces ellipsoïdes. Les travaux de PAYEN 1949 (225), POLLOC et Coll., 1951 (232) et PYKE, 1958 (237) rapportent que par dessication, les levures perdent une proportion substantielle de leurs activités fermentaires. Travaillant sur les perturbations enzymatiques des levures, PROSKURIAKOF, en 1956 (236) trouve une augmentation de l'activité à la dessication ; probablement le facteur retardant l'activité correspond-il à la diminution de la perméabilité de la membrane cellulaire, donnant une libération plus lente des enzymes dans le milieu.

Pour MERYMAN en 1960 (182), la survie de Saccharomyces Cerevisiae est de 20 pour 100 avec une dessication à 0°C, alors qu'elle atteint 50 pour 100 quand la température de dessication est abaissée à - 13°C.

Les dessiccateurs à vaporisation qui préviennent la décomposition thermique des protéines et des amino acides sont recommandés par ANDREEV, 1964 (5) pour les levures et les plantes hydrolysables. Le pouvoir fermentaire des levures n'est pas affecté en-dessous de 35 - 40° (GARANDA, 1964) (84) ; l'auteur établit une relation entre l'absence d'humidité et la rapidité de la dessication.

Essayons enfin d'obtenir une vue d'ensemble de la cryodessiccation. WICKERHAM (307), en 1942, s'intéressa à la lyophilisation des levures et à leur survie. Mises en suspension dans du sérum normal de cheval, congelées rapidement, séchées sous vide important et enfin fermées, toutes ces cultures furent viables trois mois.

Des réserves sur l'intérêt de la lyophilisation pour la conservation des souches furent émises par ATKIN et Coll. en 1949 (9). La lyophilisation doit être considérée avec soin et testée avant d'être adoptée à l'exclusion de toutes autres méthodes, car on constate en règle générale un faible taux de survie et une destruction de 99,8 pour 100 des éléments et certaines modifications du pouvoir de synthèse peuvent faire leur apparition.

Pour approfondir l'étude de la survie, un examen du pouvoir fermentaire et de l'activité enzymatique de Saccharomyces cerevisiae fut entrepris par NEI et Coll., 1954 (202). Contrairement aux autres auteurs, ils admettent que plus la congélation est rapide, plus les dommages sont grands.

Pour les organismes unicellulaires, selon GUIBERT et Coll. en 1955 (101) la lyophilisation est très traumatisante et elle conduit à un nombre élevé de destructions et de mutations. L'auteur, toutefois, nuance son opinion en indiquant que le taux de survie est fonction des conditions dans lesquelles sont effectuées les opérations de lyophilisation.

Poursuivant les mêmes travaux, BRECHOT et Coll. (33) étudièrent en 1958 la préservation des systèmes de respiration et de fermentation des produits lyophilisés. La levure, reconstituée après avoir été desséchée avec bentonite, conserve 96 pour 100 de son activité de fermentation anaérobie. Les enzymes de la respiration conservent seulement 82 pour 100 de leur activité après dessiccation ; la dessiccation sous vide en présence de P_2O_5 réduit l'activité des enzymes de la respiration et de la fermentation de 40 à 50 pour 100. La lyophilisation en présence de phosphate, d'acide ascorbique, de thiourée, de cystéine conduit à une perte de presque toute l'activité diastasique.

Des méthodes de préservation de ces micro-organismes sont examinées par RZEDOWSKA en 1959 (254) : les propriétés de cinq lignées de levure de distillerie (Saccharomyces cerevisiae) sont recherchées immédiatement après lyophilisation ; comparées avec un témoin de culture, les levures présentent une croissance plus lente et une augmentation de fermentation plus minime après 72 heures, mais trois des lignées montrent une légère augmentation de la production d'alcool ; des colonies géantes de trois espèces présentent un changement de structure morphologique.

Mais la comparaison de préparations lyophilisées de levures avec des levures fraîches, comparaison faite par BRADY en 1960 (31), n'a révélé aucun changement qualitatif dans les réactions de fermentation et dans les vitamines.

La levure qui présente généralement la plus grande activité enzymatique est celle qui a subi le moins de traitements physiques, que ce soit par centrifugation, lavage, filtration sur filtres pressés, dessiccation à température inférieure à 37° et même lyophilisation à basse température (MARTIN, 1961) (170). Une mesure manométrique du taux de fermentation et d'oxydation fut effectuée par WYANTS, 1962 (314) sur les levures traitées par lyophilisation ; un taux plus élevé d'oxygène apparaît dans les levures lyophilisées ; l'apparition de colonies anormalement petites après avoir été plaquées sur milieu solide prouve la perte par les micro-organismes de l'aptitude à l'oxydation à d'autres substrats de respiration testés.

Enfin REY, en 1962 (243) pourra peut-être nous donner une conclusion provisoire en faisant remarquer que l'inconstance des résultats provient des différences existant entre les techniques utilisées.

C H A P I T R E I I I

LYOPHILISATION DES PROTEINES

Après cette rapide étude de la lyophilisation en tant qu'opération technique, nous nous sommes intéressée à son influence particulière sur les protéines et sur les protéines enzymatiques par la suite. Nous serons amenée à envisager les principales étapes de la cryodessiccation à savoir : congélation, dessiccation et lyophilisation elle-même.

Nous reconsidérerons rapidement l'action du "quick-freezing" et son rôle bénéfique sur les protéines. Dans l'emploi du froid comme de la chaleur, la rapidité de l'opération joue un rôle essentiel pour éviter la dénaturation des protéines selon POTTIER, 1954 (235). Une congélation lente, s'était aperçu MANGEOT en 1954 (169), peut amener une concentration locale de sels et, par conséquent, une dénaturation des protéines. Dès 1955, une explication du phénomène fut donnée par TANIKAWA (285) qui soupçonna une coagulation des protéines par déshydratation ou concentration de sels entraînant la formation d'exsudats dans la chair de poulpe. Une précision fut apportée par LOVE en 1956 (154) concernant la vitesse de congélation : la dénaturation est faible avec une vitesse rapide mais elle s'accroît avec une vitesse plus lente.

Une distinction fut apportée par MIGITA et Coll., en 1956 (185) entre les protéines et la myosine : les protéines du muscle de poisson et la myosine décroissent parallèlement à la déshydratation mais les protéines non myosiniques gardent un taux constant alors que la myosine est plus rapidement dénaturée que les albumines.

PISKAREV et Coll. (228) et NIKKILA en 1957 (207) sont en accord pour indiquer que la dénaturation apparaît dans la congélation et la conservation au froid comme une des principales modifications du poisson congelé ; les protéines perdent leur solubilité dans l'eau et les solutions salées diluées. La dénaturation des protides à -20° pendant cinq mois est confirmée par MOORJANI en 1958 (190). Une précision supplémentaire fut apportée par LOVE (155) la même année : la congélation pendant 60 minutes donne plus de protéines insolubles que dans d'autres conditions ; cette accélération de l'insolubilisation n'est pas nécessairement accompagnée par une diminution de qualité.

Par contre, la dégradation autolytique des protéines de foie d'agneau, étudiée par RHODES en 1961 (245), à 15° est accélérée trois à quatre fois par congélation et décongélation. Le maximum d'activation est observé après conservation de cinq jours à - 2° et trois jours à - 10°. L'effet est attribué à l'élimination du retard précédant l'attaque de l'hydrolyse enzymatique.

Le problème de la concentration en sels du milieu a été à nouveau abordé par LOVE en 1962 (156), puis par PARTMAN, 1964 (222) : sous certaines conditions, à une augmentation de la concentration en sels du milieu par congélation, correspond une augmentation du taux de dénaturation des protéines de la chair.

L'altération pour BRUNNER, 1962 (34) par congélation ou déshydratation cause des changements indésirables dans les propriétés physiques et chimiques des protéines et des complexes lipoprotéiques qui sont dissociés ; les lipides de la membrane peuvent être extraits, selon ALEXANDER et Coll. en 1961 (1) après congélation et lyophilisation par destabilisation provenant de l'état de l'eau dans le complexe.

Une comparaison entre une congélation ultra rapide sous azote (- 196°) et à l'air (- 20°) a été établie par SUZUKI et Coll. en 1964 (279) : les protéines sont dénaturées par congélation à - 20° alors qu'à - 196°, elles ne le sont pas ; l'étude porte sur la myosine du muscle de poisson : des solutions de myosine sont fortement inactivées par une lente congélation et moins fortement par une congélation rapide. On retrouve avec CHILSON et Coll. en 1965 (41) cette question de la rapidité de la congélation qui paraît être le point essentiel.

La température de congélation est un autre aspect du problème ; selon UEOKA et Coll., 1964 (292), elle n'a pas d'effet marqué sur la solubilité de la myosine de la viande lyophilisée. Pourtant LOVE, en 1966 (157) annonce que les échantillons de muscle de poissons congelés à - 3° en milieu salé sont détériorés beaucoup plus lentement que ceux congelés à - 30° sous courant d'air. De même, la congélation à - 196°, selon l'avis de KHENOKH et Coll., 1966 (125), cause une précipitation partielle des protéines. L'auteur précise qu'environ 25 pour 100 des protéines désoxyribonucléiques précipitent après exposition à basse température ; la plus grande partie précipite après conservation à - 10° et 11 pour 100 de l'albumine à - 10°.

Mais la congélation profonde sous azote liquide, selon UTEVS'KA et Coll., en 1966 (295), suivie par une rapide décongélation, ne produit pas de changement important dans la composition des fractions électrophorétiques du sérum humain et de rats albinos. Enfin, la détérioration des protéines par congélation est bien connue par KHAN (124), COWIE et Coll., en 1966 (49). Et l'on appelle cette dénaturation : cryodénaturation (LEVITT, 1966) (147) et les protéines dénaturées : cryoprotéines GHETIE et Coll., 1964 (86).

Fort peu d'auteurs se sont intéressés à la dessiccation et à son influence. Toutefois WARNER en 1958 (301) fit remarquer que la dénaturation par la chaleur de l'albumine du plasma bovin était accompagnée par la formation de ponts SS dans la protéine. De la même manière, la formation de ponts SS accompagne la dénaturation de l'ovalbumine par la chaleur et l'alcool selon HALWER, 1954 (105).

Pour HOSMAN, 1959 (111), la dessiccation à 60° pendant trois ou quatre heures ne dénature pas les protéines.

Traitant quelques aspects de la lyophilisation moderne, NEUMANN, 1960 (206) constate que la résistance à la température des albumines et des enzymes s'accroît dès que la teneur en eau devient inférieure à 4 à 6 pour 100 tandis que ces substances sont dénaturées ou inactivées à l'état de solution ou de gel entre 50 et 60°. Une température inférieure à 25° est préconisée par NEMITZ en 1964 (204). Il a été montré que la chaleur appliquée au cours de la lyophilisation pour accélérer la déshydratation pouvait entraîner l'insolubilisation de la partie protéique déjà déshydratée alors que la partie qui doit être desséchée demeure sans dommage (Mc KENZIE et Coll., 1967) (168).

Abordons maintenant le problème dans son ensemble, en considérant la lyophilisation des protéines en général.

Quelques dénaturations des lipo-protéines, modifiant leur solubilité pendant la reconstitution, sont remarquées par COHN en 1945 (43) par lyophilisation. Par contre, une protéine comme la gélatine qui tend à se dissoudre lentement et pauvrement sans la chaleur, sera, quand elle sera lyophilisée, dissoute immédiatement après addition d'eau à la poudre. Selon CHAMBERS et Coll., 1950 (37), la lyophilisation préserve davantage certains constituants comme les protéines, le sucre et l'amidon. Toutefois, une lente dénaturation des protéines du lait par cryodessiccation est remarquée par MASTENBROEK en 1954 (173). La même année, GREAVES (93) s'intéressa à cette question et donna quelques explications du phénomène : la méthode d'évaporation sous vide à basse température sous 760 mm de Hg, n'est pas idéale car les molécules tendent à s'agglomérer en écailles. Ces molécules sont soumises à de grandes concentrations en sel de telle sorte qu'une agglomération irréversible prend place, que l'on appelle dénaturation. Ce phénomène devient très visible quand la remise en solution des produits est entreprise : le temps de dissolution est très important et la solution n'est probablement jamais atteinte. Bien que des protéines très stables puissent résister à ce traitement, d'autres plus délicates sont totalement détruites et rendues insolubles. Si la pression est de 4 mm de Hg, l'édifice de glace des solution disparaît, quittant des protéines ; les molécules se séparent alors en squelette de molécules desséchées sans s'agglomérer. Cette méthode donne des produits rapidement et parfaitement solubles et même de très fragiles protéines comme l'albumine de l'oeuf, ne sont pas dénaturées de cette façon. La dénaturation varie directement avec la température et le temps et le succès de la lyophilisation résulte généralement de basses températures de dessiccation. Les protéines lyophilisées peuvent, selon PEREZ, en 1954 (226) se garder presque indéfiniment à la glacière à - 10° sans inconvénient et l'on fait dégeler la solution au moment de l'emploi. Toutefois, nous précise l'auteur, cette méthode n'est pas sans inconvénient pour les lipo-protéines qui sont dénaturées par congélation et décongélation successives et perdent ainsi de leur activité. Selon KELTZ et Coll., 1957 (121), il est possible de cryodessécher les β lipoprotéines sans dénaturation appréciable en présence de saccharose.

La nature de la protéine doit intervenir puisque la lyophilisation du sérum augmente légèrement la concentration de toutes les globulines en diminuant celle des albumines, ont constaté PONOMAREVA et Coll. en 1958 (234). Pourtant aucune modification des protéines n'est relevée par PAUFIOUE et Coll., en 1959 (224), avant et après lyophilisation, ni en quantité ni en

nature sur l'humeur vitrée. Cette hypothèse est confirmée par FAYET, 1959 (76) puisqu'il semble bien que la constitution protéinique de l'humeur vitrée reste inchangée.

Pour contrôler le dommage causé aux protéines, CONNEL, en 1961 (44) a fait appel à l'électrophorèse. Il est évident que les protéines du sarcoplasme survivent apparemment intactes : l'électrophorèse est semblable à celle des contrôles congelés. Une large proportion de la fraction des myofibrilles survit in situ inchangée. Avec des modifications convenables, le dommage causé à la texture peut être éliminé et il est possible d'obtenir un matériel qui ne pourra pas être distingué d'un matériel non traité. La prévention de la dénaturation est difficile : quelques méthodes de stabilisation sont connues, mais elles dépendent des propriétés spécifiques de chaque protéine. Alors qu'une perte des composants électrophorétiques et ultra centrifugeables et une diminution de l'extractibilité des solutions aqueuses des protéines sont causées, selon KRONMAN et Coll., 1960 (136), par le vieillissement et la congélation de la viande, aucune modification électrophorétique du lait lyophilisé n'est remarquée par SAITO et Coll., en 1962 (256). Les protéines sont réduites de façon plus marquée quand le produit est desséché à 30 - 60° sous 50 mm de Hg que lorsqu'il est lyophilisé (ARIMOTO, 1962) (6). Une diminution de la viscosité de la myosine par lyophilisation est notée par TAKAHASHI et Coll. en 1964 (283). Des préparations lyophilisées, reconstituées en solution aqueuse de G actine, F actine, myosine, actomyosine et myosine B sont examinées par BIRO et Coll. en 1964 (27), en vue de la détérioration : la G actine montre la même possibilité de polymérisation avant et après lyophilisation, pour la myosine, l'actomyosine et la myosine B, on constate une perte d'activité adénosine triphosphatasique d'environ 5 à 20 pour 100 ; sauf pour les myofibrilles, ce dernier matériel montre une perte totale d'activité enzymatique et devient complètement insoluble quand il est lyophilisé à partir d'un gel. La myosine desséchée a perdu intégralement son activité enzymatique en 9 jours.

Les changements observés dans les protéines des produits lyophilisés sont semblables mais plus prononcés que ceux des protéines congelées. Ils sont attribués par GOLDBLITH et Coll., 1964 (91) à la dénaturation par localisation de grandes concentrations en sel. Pour poursuivre le même but, un examen de l'effet de la lyophilisation est entrepris par HETERINGTON, 1964 (109) sur le matériel desséché : la plupart des protéines demeure inaltérée si la teneur en eau est de 0,05 pour 100 pendant des années. La sérum bovine, selon LEVITT, 1966 (147) peut être lyophilisée sans perte d'activité et aucun changement électrophorétique des fractions protéiques n'est remarqué par PAFOMOV et Coll. en 1967 (217) ainsi que par PODOL'VSKI 1967 (230) par lyophilisation du plasma.

Certains auteurs ont établi une similitude entre la dénaturation protéique et la destruction enzymatique. SIZER a montré en 1943 (266) qu'avec des enzymes cristallisées comme la trypsine, la pepsine et la chymotrypsine, l'inactivation de l'enzyme par la chaleur est exactement parallèle à la disparition de la solubilité des protéines et la précipitation des protéines dénaturées par la chaleur. L'inactivation est réversible pour certaines diastases. Les ferments, selon POTTIER, 1954 (235) peuvent être classés comme protéines. Les propriétés sont les mêmes et les réactions de dénaturation sont identiques pour protéines et enzymes.

L'étude de la dénaturation des enzymes par ROBERT et POLONOVSKI de 1964 (247) montre une disparition de l'activité enzymatique proportionnelle à la quantité de protéines dénaturées et les données cinétiques et

thermodynamiques sont les mêmes pour la dénaturation et l'inactivation. De par sa nature protéique, l'enzyme est une cible de choix pour la dénaturation entraînant une inactivité irréversible (MOREAU, 1967) (191). Nous arrivons donc au problème principal de la lyophilisation des enzymes que nous traiterons dans le chapitre suivant.

C H A P I T R E I V

LYOPHILISATION DES ENZYMES

Nous n'atteindrions le but réel de notre travail si nous ne posions pas le véritable problème qui se présente à nous : Quel est le devenir des systèmes enzymatiques au cours de la lyophilisation ?

Nos recherches se sont orientées dans plusieurs directions et nous avons été amenée à envisager, successivement, l'influence de la congélation, de la dessiccation et plus généralement de la lyophilisation ou "Freeze-Drying" des auteurs anglo-saxons.

Il est connu depuis fort longtemps que certaines enzymes conservent leur activité dans les tissus tués par congélation (VOLGTLANDER et Coll., 1909) (296). Par contre, d'autres perdent leur action dans les mêmes conditions.

Déjà, en 1933, les travaux de KERSTESZ (122) et en 1949 de JOSLYN (117), complétés plus tard par de nombreuses études (118, 119), avaient montré qu'en général la congélation n'inhibait pas l'activité enzymatique qui continuait souvent dans le produit congelé, la formation de glace ayant seulement un effet retard marqué sur l'activité. Le taux de l'activité diastasique peut, certes, diminuer avec la température, mais la diminution n'est pas la même pour toutes les enzymes et la réfrigération peut apporter un déséquilibre dans la chaîne des réactions enzymatiques ; des changements peuvent d'ailleurs se produire par suite de la destruction partielle des ferments les plus fragiles comme les deshydrogénases. Une augmentation de la concentration en substrat peut déterminer une diminution de la vitesse de réaction : ceci a été confirmé pour l'invertase par KERTESZ, 1933 (122), pour les protéinases par MERGENTIME, 1946 (180), mais non pour la catalase et la lipase par KIERMEIER, 1947 (129).

POTTIER en 1954 (235) indique que le froid, plus facile à régler que la chaleur, suspend l'action des agents d'altération tels que les enzymes et les micro-organismes, mais ne les détruit pas. L'auteur remarque, d'autre part, qu'en milieu sec les diastases sont beaucoup plus difficiles à détruire ; on peut donc penser que la cryodessiccation, dont le but est la déshydratation du produit, ne leur causera pas un dommage trop important.

De même, l'activité enzymatique est, selon GANE, 1954 (185), stoppée par congélation car les changements dus à l'action chimique et enzymatique sont si ralentis qu'ils sont négligeables.

SMITH (1954) (272) relate les observations de HEPBURN (1915) (108) et de NORD et Coll. (1935) (210), selon lesquelles les enzymes gardent leur activité et peuvent même présenter une activation après congélation rapide à basse température. Un mélange de ferment et de substrat résiste aussi à une réfrigération rapide et paraît même en bénéficier dans quelques cas, par exemple lorsque la réaction catalysée est une simple réaction endothermique. Les auteurs notent que les produits sont isolés de façon bien meilleure si la congélation est rapide.

La congélation rend incohérente l'activité diastasique pour TOROK en 1955 (290). Pour avoir une réversibilité approximative du froid, il propose toutefois que les enzymes, inégalement inactivées, soient immobilisées par vitrification afin d'éviter la formation de cristaux de glace. REY, en 1960 (242) s'intéressant à la réfrigération, trouva que l'activité enzymatique était troublée ; à cela, il donna quatre explications possibles que nous approfondirons plus tard dans l'interprétation de nos résultats. La température, selon SOMMERS, 1960 (273), affecte définitivement le taux de la réaction enzymatique et dans la plupart des cas, les enzymes sont inactivées près ou en-dessous du point de congélation.

GREIFF, en 1960 (97) a confirmé les résultats de JOSLYN, en indiquant que la formation de la glace avait un effet retard marqué et que le degré de réduction de la réaction n'est pas le même pour chaque système enzyme-substrat ; la congélation peut entraîner des perturbations diastases avec accumulation de métabolites intermédiaires.

Dans la thèse de PEUZIAT, 1960 (227), on note que le froid suspend ou ralentit, suivant la température mise en jeu, l'évolution biologique, bactérienne et enzymatique. Si l'action du froid cesse, les activités se déclenchent à nouveau ; comme la plupart des auteurs, PEUZIAT pense que l'on aurait à faire à une suspension des activités au moment de la congélation qui reprendraient par la suite. Enfin, les diastases, rapportées par LEVITT en 1966 (147), comme étant inactivées par congélation, sont toutes des protéines possédant des groupements SH dans leur structure.

La cryorésistance d'une plante est en relation avec sa dessiccation et sa résistance à la chaleur et, comme LEVITT, en 1958 (143), il est raisonnable de penser que la cryostabilité des enzymes dépend aussi de leur haute stabilité à la chaleur, ce que nous allons essayer de découvrir maintenant. La température de dessiccation, selon HYATT, 1960 (112) peut produire la destruction de quelques systèmes enzymatiques dans les tissus humains congelés. Lorsque la température croît avec la diminution de l'humidité résiduelle de la substance, l'activité enzymatique de certains corps albuminoïdes, reste par exemple presque inchangée, même quand ceux-ci sont soumis pendant une heure à 100° ; on peut donc utiliser des températures élevées pour la dessiccation finale. Certaines préparations ayant plus de 5 pour 100 d'humidité résiduelle perdent déjà environ 40 jours après lyophilisation toute activité enzymatique. Avec une humidité résiduelle de 2,5 à 3 pour 100, l'activité accuse une nette diminution au bout de 110 jours. Avec une humidité résiduelle de 1,6 pour 100, la diminution est moins prononcée, avec une humidité de 0,6 pour 100, l'activité après six mois est pratiquement inchangée (NEUMANN, 1960) (206).

La plus grande majorité des enzymes pures est instantanément inactivée à 70° et après un court instant à 60°C et même plus bas, selon DIXON en 1964 (62). Un petit nombre peut survivre à une haute température et un très petit nombre à un chauffage prolongé à 100° avec peu ou pas de perte d'activité. Après de nombreuses études, DIXON arrive aux conclusions suivantes :

- Les enzymes stables à la chaleur sont caractérisées par leur faible poids moléculaire alors que les enzymes labiles le sont par leur haut poids moléculaire.

- Les enzymes stables ne contiennent pas de groupement SH alors que les enzymes labiles en possèdent ; nous retrouvons ici les hypothèses précédentes de LEVITT sur les protéines et leur groupe SH. La moitié des diastases stables à la chaleur, comprenant celles qui sont très thermostables, contient aussi des groupes SS (LEVITT, 1966) (147). Nous voyons ici l'important problème de la nature chimique de l'enzyme et de sa structure que nous reprendrons dans l'interprétation.

Enfin, essayons de trouver maintenant l'influence de la lyophilisation sur les systèmes enzymatiques.

Selon FLOSDORF (1949) (78), les enzymes, les hormones et les vitamines sont maintenues non détériorées, sans aucune perte de leurs propriétés, soit pendant la cryodessiccation, soit pendant la longue conservation qui suit. GERSH et Coll., 1954 (85) rapportent l'hypothèse de DOUNCE (1950) sur la bonne protection par lyophilisation de quelques enzymes, alors que d'autres ne le sont pas, selon MANGEOT (1954) (169). A partir du moment où le produit est congelé, aucune modification diastasique n'est possible, ni au cours de la cryodessiccation, ni au cours de la conservation. Les nombreuses recherches histologiques et histochimiques de BILLIGHAMM, 1954 (26) sur les tissus préservés par lyophilisation ont établi que, si le tissu frais est congelé aussi rapidement que possible et si la déshydratation est effectuée à température suffisamment basse, la micro-structure et la constitution biochimique, y compris les systèmes enzymatiques sont préservés sans changement essentiel. De même COUDERT, 1960 (47) et HACKENBERG, 1962 (98) pensent que la lyophilisation doit être utilisée pour dessécher les substances instables telles que les solutions enzymatiques et qu'elle a des résultats pratiques très intéressants.

Enfin, peut-être, est-ce l'explication de DIXON de 1964 (62) qui nous donnera le plus de satisfaction. La conservation des enzymes sans perte d'activité est quelquefois un problème. Quand une diastase peut être congelée et réchauffée, sans perte d'activité, il est plus simple de la conserver dans l'état profond de congélation où elle sera stable plusieurs mois. Quelques enzymes sont stabilisées par de grandes concentrations de sels et peuvent être conservées sans perte pendant longtemps. La dessiccation d'une solution d'enzyme à la température de la pièce cause habituellement une complète inactivation, mais la dessiccation sous vide, à basse température à partir d'un état congelé, en un mot la lyophilisation est une méthode valable, donnant souvent une poudre active et soluble qui peut être conservée à la température de la pièce. Et, confirme DENDEL, en 1964 (60), la cryodessiccation permet la conservation de tissus pour greffes, de substances protéiques thermolabiles et enfin d'enzymes. Dans les organes de lapin congelés et lyophilisés, on retrouve, selon REY, 1964 (244), l'existence de radicaux libres attribués à la permanence au niveau des cellules, de réactions biochimiques correspondant à des phénomènes enzymatiques dont l'intensité

reste néanmoins faible. D'autre part, dans l'oignon ou l'ail où l'action enzymatique est nécessaire au développement de l'odeur, CHICHESTER, en 1964 (38) remarque une augmentation significative de cette odeur par lyophilisation qui, comme la congélation, préserverait donc l'activité diastasique.

Récemment enfin, en 1967, ASHMARIN et Coll. (8) ont distingué deux catégories de systèmes enzymatiques : ceux relatifs à la respiration des tissus qui se trouvent assez stables à la lyophilisation et à la conservation qui suit et ceux, comme les systèmes glycolytiques qui sont labiles aux mêmes opérations.

Les quelques hypothèses que nous venons de passer en revue nous ont laissé entrevoir la complexité du problème :

Y-a-t-il, par lyophilisation, destruction totale de l'enzyme, inactivation passagère, conservation intégrale ou enfin peut-être activation ?

L'examen séparé de chaque enzyme, prise en particulier, nous permettra d'apporter quelques éclaircissements sur la sensibilité spécifique de chaque diastase à la cryodessiccation. Nous adopterons pour ce travail le plan de la classification précédente des enzymes :

- Oxydoréductases,
- Transférases,
- Hydrolases,
- Lyases,
- Isomérases,
- Ligases.

OXYDOREDUCTASES

Des études ont été faites par CHILSON, COSTELLO et KAPLAN (1965) (37) sur l'alcool dehydrogénase de la levure et du foie de cheval et sur la lacticodeshydrogénase appelée maintenant lactate dehydrogénase, du muscle cardiaque après congélation et décongélation qui sont les deux premières étapes de la lyophilisation. Ces auteurs sont arrivés pour les deux enzymes considérées aux conclusions suivantes : la vitesse de congélation et de décongélation détermine le degré de l'inactivation enzymatique, la lenteur de la congélation et de la décongélation, l'importance de cette inactivation. Mais il est possible de protéger les diastases par des agents protecteurs ; avec une solution de phosphate ou de chlorure de sodium 0,3 - 0,9 M, l'inactivation est inférieure à 10 pour 100. L'éthylène glycol, le propylène glycol et le glycérol ont la même action ; en principe les agents protégeant contre les dénaturants protègent aussi contre la congélation. Une activité lactate dehydrogénasique avait été rapportée par KUHLMAN, en 1959 (137) dans la cornée lyophilisée du chat, du rat et du lapin. OBAYARI et Coll., 1960 (212) ont précisé en étudiant l'influence de la cryodessiccation sur les lactobacillus que l'activité de la L lacticodeshydrogénase augmente alors que la D lacticodeshydrogénase ne change pas chez les bactéries produisant de l'acide lactique D.

DASTUGUE, JACQUEMET, BASTIDE, SIMON et GREZE, en 1961 (54) ont montré que l'activité de cette enzyme qui a donc survécu croît d'une manière très nette au cours de la conservation du plasma lyophilisé : une explication de ce phénomène sera donnée au moment de l'interprétation de nos résultats. Enfin, citons toujours dans le laboratoire du Professeur DASTUGUE, les travaux de BALLADE, OGIER, BASTIDE et DASTUGUE, de 1964 (10) sur l'activité lactate dehydrogénasique du thymus lyophilisé d'agneau.

L'activité 3 hydroxybutyrate dehydrogénasique a été utilisée dans les récents travaux de LUSENA, 1965 (161) pour tester le dommage causé aux mitochondries par le système congélation-décongélation. Ce dommage résulte d'une combinaison des effets non seulement de la température et de la concentration en sucre de la solution mais aussi de la diffusion de ce sucre. Le maximum d'inactivation apparaît à -15°C alors qu'en-dessous de -40° , aucun dommage n'est détecté.

En 1966, LUSENA et Coll. (162) travaillèrent sur une suspension de mitochondries de foie de rat dans du saccharose 0,44 M qu'ils congèlent et décongelent dans des conditions déterminées. Ils concluent que, lorsque les deshydrogénases ne sont pas libérées par congélation, aucun changement n'apparaît ensuite.

ULRICH et HEBER (1961) (294) sont incapables de détecter une perte d'activité malate dehydrogénasique par congélation. Une étude comparée de l'enzyme malique du muscle de poisson congelé et non congelé a été faite par GOULD en 1964 (92). La diastase montre une augmentation marquée de son activité spécifique immédiatement après congélation du tissu. Ce taux d'activité est maintenu si le poisson est conservé à -29°C pendant quatre mois, mais il y a un déclin graduel lorsqu'il est stocké à -7° et l'activité tombe à 50 pour 100 du taux initial pour la morue, 65 pour 100 pour la plie et 70 pour 100 pour l'aiglefin après quatre mois à -7° . Or, au cours de la lyophilisation, après congélation, la période de dessiccation sous vide s'accompagne d'une augmentation de la température jusqu'à température ambiante semblable à ce qui se passe à la conservation.

KUHLMAN, en 1959 (137) a également travaillé sur la malicodeshydrogénase dont l'activité persiste après lyophilisation, dans la cornée de chat, de rat, de lapin ; l'activité deshydrogénase malique est intacte, selon HYATT, 1960 (112) dans les greffons dermoépidermiques de peau humaine lyophilisée.

Toujours dans ses travaux consacrés à la cornée lyophilisée, KUHLMAN, en 1959 (137) a signalé la présence de deshydrogénase citrique au niveau de l'épithélium cornéen, ce qui semblerait bien prouver la non destruction de cette enzyme par lyophilisation.

En ce qui concerne la glucose-6-phosphate deshydrogénase, KUHLMAN 1959 (137) et HYATT, 1960 (112) sont en accord pour trouver, l'un dans les cornées lyophilisées, l'autre dans les greffons de peau, une conservation de l'activité de ce ferment. Selon BALLADE et Coll., en 1964 (10), le thymus lyophilisé d'agneau fournit également une glucose-6-phosphate deshydrogénase. Cette enzyme qui se trouve aussi dans les noyaux thymiques de veau n'est pas inactivée par lyophilisation en milieu saccharosé et par un épuisement par les solvants organiques ; elle se montre plus active en milieu saccharosé qu'en milieu non aqueux, selon MIRSKY (187) et STERN et MIRSKY (274) en 1959.

La 17 β hydroxystéroïde dehydrogénase, qui est normalement très instable, non seulement est inactivée par congélation et décongélation, mais perd souvent son activité rapidement à des températures supérieures à la congélation. De plus, avec 50 pour 100 de glycérol, elle est complètement stable à 2 ou 5°C pour une année et elle résiste à un chauffage de 65° - 68° sans perte d'activité. D'autres glycols, sucres et autres solvants exercent aussi un rôle protecteur, BOYER et Coll. en 1960 (30).

WASSERMAN et Coll., en 1958 (302) étudiant l'oxydation du glucose et du 2 céto gluconate par des préparations lyophilisées de Serratia marescens montrent quelques différences dans la composition enzymatique, différences qui peuvent apparaître comme le résultat de la cryodessiccation. Le système peut être inactivé par cette opération et réactivé par incubation en présence de substrat.

L' α glycérophosphate dehydrogénase, selon GOULD, 1964 (92) qui poursuivait ses recherches sur le poisson congelé, augmente rapidement à - 7° pendant deux à quatre semaines puis l'activité diminue lentement pendant les deux premiers mois pour augmenter ensuite graduellement.

Pour la triose phosphate dehydrogénase, nous nous reporterons aux travaux de CHILSON et Coll., de 1965 (41) qui aboutissent aux mêmes conclusions que pour la lacticodeshydrogénase.

En se penchant sur le problème de la phosphorylation oxydative, GREIFF et Coll., en 1961 (98) étudièrent l'influence de la lyophilisation sur des suspensions de mitochondries. Selon ces auteurs, l'intégrité des enzymes est préservée par congélation et conservation à basse température. Au contraire de la plupart des auteurs, GREIFF indique que la phosphorylation est préservée de façon bien meilleure par congélation lente que par congélation rapide ; une diminution de 25 pour 100 de la phosphorylation est observée dans des préparations congelées lentement à - 7° ou - 192°C. L'activité enzymatique n'est pas altérée dans des préparations de mitochondries dans du saccharose isotonique, congelées lentement à - 76° en présence de glycérol comme protecteur (10 pour 100) ; mais une dessiccation par sublimation sous vide à différentes températures rend inactive la préparation après réhydratation. Ce mode de dessiccation n'est peut-être pas idéal mais on peut penser que les systèmes enzymatiques de la phosphorylation ne sont pas touchés par lyophilisation et en particulier la phosphoglycéraldéhyde dehydrogénase qui en serait l'enzyme essentielle.

La xanthine oxydase résiste à la congélation puisque COLE et Coll., en 1959 (41) ont trouvé une activité diastasique après congélation de la crème blanche à la fois dans le culot et dans le surnageant de la centrifugation. Le principal effet d'une congélation lente est de rassembler les globules gras de telle sorte qu'une altération de la membrane puisse apparaître et qu'une union des globules puisse naître à la décongélation. Nous retrouvons ici le problème des lipoprotéines que nous approfondirons plus loin.

De nombreux auteurs se sont intéressés à la conservation de la succinate dehydrogénase par lyophilisation ; leur point de vue diffère quelquefois : dans le cadre des deshydrogénases, des thrombocytes humains, lors de la destruction cellulaire après congélation et décongélation, l'activité succinodeshydrogénasique diminue proportionnellement à la lyse thrombocytaire (KOPPEL et Coll., 1954) (135). Le dommage causé dans les cornées par

congélation et décongélation est, selon ILIFF, en 1956 (113), minime quand le tissu est congelé dans une solution de glycérol et l'auteur considère cette conservation de l'enzyme comme un élément essentiel pour affirmer l'efficacité de la méthode. Travaillant sur le tissu épiphysaire de l'os, l'auteur pose le problème de la température de congélation puisqu'à -25° , l'enzyme est préservée et qu'à -75° l'activité diminue. BOYER et Coll., en 1960 (30) rendent compte d'une inactivation de cette diastase par congélation. Le poisson congelé à -30° pendant 12 jours, pour GLIOLITTI (89) perd son activité succinate dehydrogénasique, ceci par comparaison avec le poisson frais ; cette méthode est préconisée pour différencier le poisson frais du poisson congelé. Des coupes congelées de thymus de lapin, de rat, de souris et de cobaye conservent, selon GYEVAI et Coll., 1961 (103) une activité deshydrogénase succinique. Une diminution de cette activité est notée par WARAVDEKAR et Coll. en 1964 (299) dans les mitochondries de foie de souris ; l'enzyme est moins affectée par congélation dans la glace sèche. EMDIN et Coll., 1965 (71) ont testé l'activité des fibres du muscle et du coeur de poisson congelé : alors que dans le muscle, l'enzyme n'est pas détectable pendant plus de 15 jours de congélation, dans le coeur, elle est présente quatre à cinq mois. Dans les mitochondries de cerveau, préservées dans des solutions hypotoniques, l'activité succinique deshydrogénasique est stimulée (20 pour 100) tandis que l'activité de mitochondries, désintégrées par congélations répétées et décongelations, n'atteint pas un taux aussi élevé, GULIDOVA et Coll., 1967 (102). Retenons des conclusions de MORONE de 1957 (194) sur la cornée, que la lyophilisation dans son ensemble n'a pas d'influence sur la diastase succinique qui reste inaltérée en qualité, quantité et répartition. Mais HYATT en 1960 (112) bouleversa toutes nos hypothèses en affirmant la disparition de toute activité fermentaire dans les greffons lyophilisés dermoépidermiques de peau humaine. La lyophilisation de différentes espèces de bactéries change, selon KUSHNAREV et Coll., en 1961 (142) leur activité enzymatique : il est démontré que l'activité est troublée par une réaction d'inhibition compétitive de la diastase.

KLINKHAMER et EICHEL, 1962 (133) se sont intéressés plus particulièrement à la "succinoxydase" qui, en faisant toujours partie des deshydrogénases, transfère l'hydrogène sur l'oxygène. Ces auteurs établissent des comparaisons entre des homogénats de coeurs normaux et de coeurs congelés ; les cryohomogénats montrent une activité respiratoire plus grande que celle des homogénats de coeurs normaux ; l'intégrité de structure des mitochondries est si bien conservée que le système de la succinoxydase fonctionne au maximum ; les cryohomogénats apparaissent donc comme un nouveau mode d'étude des enzymes. WARAVDEKAR, en 1964 (299) rappelle que la succinoxydase est diminuée, dans une grande mesure, par tous les procédés de congélation utilisés.

Ce même auteur, toujours en 1964 (299) rend compte d'une augmentation par congélation et décongélation, de l'activité glutamate dehydrogénasique qui est basse dans les préparations de foie de souris. Considérant le dommage causé aux mitochondries, LUSENA en 1965 (161) arrive aux mêmes conclusions que pour la 3 hydroxybutyrate dehydrogénase.

Disons rapidement qu'une activité glutathion réductase est signalée par KUHLMAN, en 1959 (137) de même intensité dans les extraits épithéliaux, cornéens, lyophilisés de chat et de lapin.

Pour les cytochromes, HYATT, 1960 (112) constate une perte d'activité de la cytochrome réductase des tissus humains par cryodessiccation

et MORONE, 1957 (194) n'indiquait aucun changement de la cytochrome oxydase de cornée de boeuf après lyophilisation. Beaucoup d'enzymes sont actuellement préparées par congélation des tissus qui, eux, seront tués par cette même réfrigération. La cytochrome oxydase est obtenue dans sa forme active par extraction à partir de matériel lyophilisé car, protéine à groupement SH, elle peut être lyophilisée sans perte d'activité d'après COOPERSTEIN, 1963 (46).

L'acide ascorbique oxydase, selon KUPRIANOFF, en 1961 (141) est encore active à -20°C .

S'intéressant à l'influence de la congélation des plantes sur les modifications enzymatiques, MARUTYAN et MANTASHYAN, 1961 (172) indiquent une différence d'activité polyphénoloxydasique dans le liber et le xylème. Dans ce dernier, l'activité est inchangée par congélation et on note un taux plus élevé des processus d'oxydation pendant la période végétative chez les variétés résistant à la congélation. DRAUDT et Coll., 1966 (68) pensent que la polyphénoloxydase est plus stable, dans les fruits lyophilisés, aux faibles taux d'humidité, mais qu'elle devient relativement instable à 8 pour 100 d'humidité et au-dessus et on aborde ici le problème de l'humidité résiduelle.

CARRICK, en 1929 (36) a trouvé que la congélation extrême des poires dans lesquelles la plupart sinon toutes les cellules sont tuées, réduit de façon marquée l'activité catalasique. Par contre, la réfrigération, pendant 9 heures à $-7,5^{\circ}$, augmente l'activité du tissu vasculaire, mais après 20 heures, l'activité est réduite. KIERMEIER, 1947 (129) observe que, non seulement la catalase conserve son activité après congélation, mais est encore plus active dans les liquides congelés que dans ceux conservés simplement au froid ; on peut d'ailleurs généraliser ceci pour de nombreuses autres enzymes ; on retrouve aussi l'influence d'une congélation rapide plus souhaitable qu'une congélation lente sur l'activité diastasique. MARUTYAN et Coll., en 1961 (172) spécifient que l'activité de la catalase tombe à 50 pour 100 à basse température. Bien qu'ULRICH et Coll., 1961 (294) ne réussissent pas à détecter une inactivation de la catalase par congélation des tissus, SHIKAMA, en 1963 (264) confirme la dénaturation partielle de cette enzyme par congélation et décongélation et remarque l'influence de la température, du pH et de la concentration. Le maximum de dénaturation apparaît de -12°C à -75°C , ce phénomène est dû aux changements de structure de la glace autour des molécules de protéines. L'influence de la dessiccation est à noter, selon PROSKURYAKOV et Coll., 1956 (236) comme une perte d'activité catalasique. Mais la catalase cristallisée est protégée de la dénaturation thermique par les mono et les disaccharides simples pour KIERMEIER et Coll., en 1957 (130). La catalase, ont trouvé GERSH et Coll., 1954 (85), est à demi-inactivée dans le matériel lyophilisé et WOJTASZEK, 1960 (312) a étudié l'influence des différentes méthodes de lyophilisation sur l'enzyme. L'activité change le moins lorsque le produit est desséché à $18-20^{\circ}$ dans un courant d'air après avoir été congelé ; la diminution est de 10 pour 100. Par dessiccation, à 40° , sous pression normale, la catalase augmente de 20 pour 100 et par dessiccation à 105° sous pression normale, on arrive à une inactivation complète de même que pour les peroxydases. Etudiant la conservation des enzymes, DASTUGUE et Coll., en 1962 (55) rapportent l'activité catalasique du plasma lyophilisé et reconstitué, mais remarquent d'autre part que la cryodessiccation a altéré une partie de l'activité puisque le pourcentage de substrat métabolisé passe de 27,2 pour le plasma frais à 18,7 pour le

produit lyophilisé, en considérant la même dilution et le même temps d'incubation. Le pourcentage de catalase inchangée varie de 7 à 22 pour 100 suivant les conditions de l'opération. Le matériel peut avoir une activité nulle ou considérable suivant la méthode utilisée (DEISSEROTH et Coll., 1967) (59). Une activité catalasique avait aussi été découverte par OGIER, BASTIDE et DASTUGUE, 1966 (213) dans les lyophilisats de thymus d'agneau, activité très inférieure à celle du foie lyophilisé de veau.

Une augmentation de l'activité peroxydasique et tyrosinasique par congélation a été montrée déjà en 1935 par NORD et Coll. (210). Des études faites par WOJTASZEK, 1960 (312), il ressort que les peroxydases voient leur activité subir des changements minimes lorsque la congélation se fait à -83°C , puisque la diminution de l'activité est seulement de 7,5 pour 100. Les activités peroxydasiques du xylème sont inchangées, selon MARUTYAN et Coll., en 1961 (172). A des températures ultra basses de congélation, les peroxydases ne montrent pas de changement mais à la décongélation, elles augmentent, selon NEGISHI, 1964 (201). Des fruits lyophilisés, à différents taux d'humidité, font l'objet, pour DRAUDT et Coll., 1966 (68), d'une diminution rapide de l'activité peroxydasique.

TRANSFERASES

AMANO et Coll., en 1954 (3) trouvent que le système enzymatique qui catabolise le glycogène dans le muscle semble être légèrement activé par congélation. De même JONES et MURRAY, 1961 (116) pensent que le système glycolytique est actif à -30° dans le muscle congelé après deux et quinze semaines. Selon MATHESON, 1962 (174), une perte en glycogène apparaît dans la viande conservée à un taux d'humidité comparable à celui des produits lyophilisés ; la diminution est attribuée à l'activité enzymatique qui persiste à 3 pour 100 d'eau et souvent plus bas.

La nucléoside phosphorylase, selon MIRSKY, 1951 (186) est présente dans le matériel lyophilisé à une concentration généralement plus grande dans le noyau que dans le cytoplasme ; en 1953 (274), MIRSKY et STERN retrouvent cette même activité dans les noyaux thymiques lyophilisés de veau. La phosphorylase peut être préparée à partir de jus de pommes terre lyophilisées, sans addition de groupements SH protecteurs (BAUM et Coll., 1953) (19). Toutefois, en 1957, SWARZ et Coll. (280) remarquent que la nucléoside phosphorylase est si labile à la chaleur que sa mise en évidence n'a pas pu être faite avec des résultats quantitatifs.

GREEN et Coll., en 1945 (95) affirmaient qu'il n'y avait pas de modifications appréciables des activités aspartate et alanine amino transférases dans les broyats d'organes congelés et, selon CAMARATA et Coll., 1951 (35), l'activité des préparations cryodesséchées se conserverait trois semaines à la température du laboratoire. Aucune perte par congélation n'est signalée par ULRICH et Coll., 1961 (294) pour la glutamate oxalacétique transaminase. Enfin, selon les récents travaux de OGIER, BASTIDE et DASTUGUE, 1966 (214), sur les transaminases, on peut, semble-t-il, affirmer l'existence de ces enzymes après lyophilisation dans le thymus de l'agneau ainsi que dans le foie de veau ; déjà, en 1962, et toujours dans notre laboratoire, des activités transaminasiques avaient été décelées par DASTUGUE et Coll. (51) dans des préparations cryodesséchées de levures.

Dans le groupe des phosphotransférases, KUHLMAN, 1959 (137), étudiant l'hexokinase, a décelé l'activité de cette enzyme dans l'épithélium cornéen lyophilisé.

L'étude de la créatine phosphokinase contenue à un taux assez élevé dans le thymus lyophilisé, a été faite par OGIER et Coll., en 1965 (213).

Bien que la myokinase ou adénylate kinase soit une enzyme à groupement SH, qui devrait donc être sensible à la dénaturation, elle présente, selon SWARZ et Coll., 1957 (280) un maximum de stabilité à la chaleur ; mais cela semble être dû à la présence d'une substance protectrice car, si cette enzyme est dialysée, elle est complètement inactivée par ébullition. NODA, en 1958 (208) poursuit ces hypothèses en indiquant que cette diastase peut même être lyophilisée sans perte d'activité, ceci étant dû à l'action des stabilisateurs.

WARAVDEKAR, 1964 (299), travaillant sur les mitochondries de foie de rat, a constaté que l'activité de la N.A.D. phosphorylase est inchangée dans la glace sèche à -79° , dans l'isopentane à -155° et dans le propane à -175° pendant 15 minutes et par une décongélation à $23 - 24^{\circ}$ pendant 7 minutes. Selon KIER et Coll., 1965 (120) la nucléotidyltransférase (ARN), quand elle est préparée et conservée en présence de 2 mercaptoéthanol, ne subit aucune perte d'activité pendant 2 mois à 0° et une année à -70°C ; en l'absence de mercaptoéthanol, elle commence à perdre son activité après 5 jours à 0°C .

La ribonucléase, lyophilisée en présence d'acide acétique à 50 pour 100, pour MOORE, 1964 (189) donne naissance à un dimère totalement actif : deux molécules de l'enzyme sont jointes l'une à l'autre de telle sorte que les deux centres actifs sont préservés.

HYDROLASES

MIRSKY, en 1951 (186) a retrouvé des estérases dans la plupart des noyaux congelés ; de même dans des coupes de tissus congelés à -20° GERSH et Coll., 1954 (85) trouvent stable la cholinestérase du cortex cérébral.

Une activité aliestérasique a été évaluée par OGIER et Coll., en 1965 (213) dans le thymus lyophilisé d'agneau ; cette activité croît quand on remplace, dans le substrat, la chaîne laurate par la chaîne acétate puis par la chaîne caprylate.

En 1942, SIZER et JOSEPHSON (269) puis en 1961, KUPRIANOFF (134) ont affirmé que la lipase était encore active à $-24,5^{\circ}$ et à -20° , mais les premiers notent une chute de la vitesse enzymatique pendant la congélation qui peut être due à l'indisponibilité de l'eau pour l'hydrolyse. Une étude enzymatique, datant de 1932, du matériel lyophilisé, fut faite par BEHERENS qui retrouve, en 1939 (20), une activité lipasique dans ce matériel pulvérisé et séparé par flottation dans un solvant non aqueux. KIERMEIER (129) renouvelle en 1947 les mêmes observations qu'il avait déjà faites pour la catalase. La lipase des aliments lyophilisés est active à très basse humidité selon DRAUDT et Coll., 1961 (67) ; mais un changement de l'énergie d'activation à 0° est noté par DIXON et Coll., en 1964 (62).

Dans des coupes conservées à -20° , les phosphatases sont stables et DOYLE (66) considère en 1950 que la méthode de congélation est utilisable pour d'autres enzymes considérées comme labiles.

Une inactivation complète de la phosphatase acide par congélation profonde à -8° dans les deux jours est admise par SCHWART et Coll., en 1956 (261) ; par contre, selon HYATT, 1960 (112), la phosphatase alcaline reste intacte ; cette même phosphatase est présente dans le culot et le surnageant de la centrifugation de la crème blanche congelée lentement et décongelée d'après COLE et Coll., 1959 (41). Des préparations enzymatiques de fragment de duodénum, de jéjunum et d'iléon, montrent, selon TOURNAIRE et Coll., 1966 (291), une persistance de l'activité phosphatasique acide et alcaline après congélation à -40°C . La phosphatase acide de la prostate est protégée, selon JEFFREE, en 1956 (115) de la dénaturation thermique par la gélatine, les protamines, l'amidon, le saccharose et les glycols : les sucres à forte concentration "déshydratent" l'enzyme et on connaît le rôle important de l'eau dans la dénaturation.

DEANE et DUMPSEY, en 1945 (58), ERNEL, en 1946, ont étudié qualitativement, après lyophilisation, les phosphatases de nombreux organes : intestin, rein, foie, estomac, pancréas et épithélium utérin. Seuls WANG et GROSMAN (298) peuvent discerner une amélioration de l'activité de ces enzymes. Peu après, en 1948, DOYLE (65) a indiqué quantitativement la préservation des phosphatases par lyophilisation des organes et par d'autres méthodes de déshydratation : la phosphatase acide est beaucoup mieux protégée que la phosphatase alcaline. Les activités phosphatasiques, selon NAIDOO et Coll., 1956 (198) de coupes de cerveau lyophilisé sont du même ordre que celles trouvées dans le cerveau frais. MORONE, en 1957 (194), accentuant l'hypothèse de DOYLE affirme que la phosphatase alcaline présente, dans le produit frais, a disparu dans le produit lyophilisé et HYATT, en 1960 (112) conclut en indiquant que les greffons artériels lyophilisés contiennent des quantités nettement réduites de phosphatase alcaline ou même n'en contiennent pas du tout. Au niveau des greffons cornéens lyophilisés, SZWARC, 1961 (281) se contente de signaler une variation des activités phosphatasiques ; enfin, la phosphatase alcaline, dans le thymus entier, apparaît, selon BALLADE et Coll., en 1964 (10) moins active que son homologue acide.

Aucune perte appréciable dans l'activité de la désoxyribonucléase du pancréas n'est révélée par GHOSH, en 1956 (87) après lyophilisation.

OGIER et Coll. (213) indiquent en 1965 une hydrolyse du β benzoyl L arginine éthyl ester par une suspension de thymus lyophilisé d'agneau, ce qui semble bien être une preuve de la présence de cette enzyme après cryodessiccation.

Abordons maintenant l'étude de l'amylase : WEITH (306) remarque en 1960 que la dessiccation à basse température (45°) diminue, en général, la quantité d' α amylase du malt. La dessiccation au four cause une inactivation notable des amylases mais les températures utilisées pour la production du malt n'endommagent pas l'amylase si elles sont appliquées pendant un temps très court. La β amylase des patates douces n'est pas dénaturée de façon marquée par une température de $60 - 65^{\circ}$, BOYER et Coll., 1960 (30). L'inactivation de l' α amylase salivaire par les hautes pressions est notée par KITAMURA, en 1965 (132) ; la confirmation est donnée par MIYAGAWA et Coll., 1965 (188) qui préconise une réactivation de l'amylase par pression modérée. Nous rencontrons donc ici l'influence de la pression sur l'activité enzymatique. Selon LEVITT, en 1966 (147), la plus stable des 2 α amylases contient des groupements SS alors que la moins stable n'en a pas ; pour expliquer cela, on pense que si le premier effet de la dénaturation par la chaleur implique les groupes SS, le second comprend la rupture des ponts

hydrogène. Enfin, AMADO (2) s'intéressant, en 1963, à la lyophilisation, dans son ensemble, d'Aspergillus orizae, montre que l'activité amylasique n'est pas altérée si l'on opère dans de bonnes conditions. Il confirme l'importance de la rapide congélation et du vide poussé et il cite le glycérol comme protecteur de la diastase.

Une augmentation de l'activité de la zymase est rapportée par NORD et Coll., en 1935 (210), dans des solutions congelées sous certaines conditions et une diminution dans d'autres circonstances. Ils expliquent le fait de la façon suivante : pendant une exposition à la congélation, des particules de solutions aqueuses de biocolloïdes seront désagrégées ou agglomérées selon la concentration des particules qui prévaut. Selon MYERS et Coll., 1956 (196), la technique de lyophilisation est utilisée pour différentes espèces de levures dans le but de détruire l'activité de la zymase et de préserver celle de la lactase ; en plaçant la levure dans des conditions déterminées, on dessèche, sous forme de "spray" à 170 - 150°F et on obtient un produit qui hydrolyse la lactose à 123°F, en quatre heures. En 1956, MYERS et Coll. (196) ont indiqué que les levures congelées à 0° pour inactiver la zymase et desséchées sous vide, présentaient une activité lactasique.

L'activité α D glucosidasique de la levure lyophilisée, qui persiste donc après cryodessiccation, croît au cours du stockage à 4° pour se stabiliser ensuite d'après DASTUGUE et Coll., en 1962 (51).

A basse température, pour WALLENFELS et Coll., 1960 (297), la galactosidase est exceptionnellement stable.

L'hydrolyse du sucre par la β H fructofuranosidase paraît, pour KERTESZ, en 1942 (123), beaucoup plus lente dans un mélange congelé que dans un mélange liquide. Cette différence de vitesse confirme l'opinion de SIZER et Coll., 1942 (269) sur le changement de phase qui peut être la cause du changement de taux de l'action enzymatique. POTTIER (235), SMITH (272), en 1954 et KUPRIANOFF en 1961 (141) sont en accord pour trouver que l'invertase résiste à une exposition de 45 minutes à - 191° pour l'un, à une congélation de - 18° pour l'autre et à - 20° pour le dernier. L'activité invertasique, pour PROSKURYAKOV et Coll., en 1961 (236), subit des pertes au cours de la dessiccation mais DASTUGUE et Coll., 1962 (51) ont dosé l'activité invertasique de préparations lyophilisées de Saccharomyces cerevisiae, activité qui n'est donc pas détruite à 37°.

FLOSDORF (79) indique en 1954 que des préparations lyophilisées de hyaluronidase purifiée sont actives pour favoriser l'administration de liquide sous cutané.

Etudiant l'effet de la congélation sur la β glucuronidase, PARRINI, 1960 (221) en conclut que cette enzyme est l'une des plus résistante à une congélation à - 25° et - 75°C. Une activité β glucuronidasique a été remarquée très importante dans le thymus lyophilisé d'agneau par BALLADE et Coll., en 1964 (10).

La diphosphopyridine nucléotidase, selon GERSH et Coll., 1954 (85) est stable à - 20° dans des coupes de tissus congelés.

De même par congélation à - 20°, OSHIRO note, en 1965 (215), une augmentation de l'activation de la protéase pendant la première période

de conservation. Récemment, en 1966, KHAN (124) affirme qu'une congélation lente cause un plus grand dommage et une plus grande fuite des enzymes protéolytiques qu'une congélation rapide et, pour PROSKURYAKOV, 1961 (236) l'activité protéolytique ne perd pas toute sa valeur par dessiccation de la levure.

Considérant les peptidases, ARPAI (7) montre en 1961 une augmentation de l'activité peptidasique après congélation durant une année par comparaison avec des cellules normales, en suspension, de Bacillus mesentericus, Clostridium sporogenes et Pseudomonas fluorescens la peptidase est stable et bien préservée par lyophilisation, selon GERSH et Coll. en 1954 (85) dans des coupes de tissus congelés à -20° .

Le plasma lyophilisé et reconstitué, que la cryodessiccation n'a pas altéré, selon BASTIDE et Coll., 1962 (16) se montre encore plus stable en ce qui concerne l'activité leucine amino peptidasique que le plasma, séparé au moment de l'emploi au cours de la conservation. De même la L.A.P. est très active dans le thymus lyophilisé de l'agneau pour BALLADE et Coll. 1964 (10).

L'inactivation par la chaleur de l'enzyme est due à la dénaturation de la protéine pour SUMMER et Coll., 1950 (278) ; la trypsine pure est inactivée sur des substrats à 90° mais elle retrouve son activité quand la solution est refroidie : c'est un exemple de dénaturation réversible de la protéine ; le procédé est irréversible quand un sel neutre est ajouté à la solution chaude, il y a alors dénaturation et floculation. La dénaturation qui coïncide avec la perte réversible de l'activité est probablement due à un déroulement des chaînes polypeptidiques de la trypsine à la suite duquel la disposition des groupements du substrat sur la surface de l'enzyme est modifiée. Un réarrangement des chaînes polypeptidiques peut prendre place par refroidissement. DIXON et Coll. (62) notent, en 1964, sans préciser davantage, un grand changement d'activité pepsique et tryptique par les basses températures alors que SIZIER et Coll. (269) trouvaient en 1942 la trypsine active à -15° .

Après séparation et purification par fractionnement par Na_2SO_4 et adsorption des impuretés par un gel de phosphate de calcium, une solution de L asparaginase, selon MEISTER, 1955 (178) peut être conservée à l'état congelé sans perte d'activité pendant quelques semaines.

Les cellules, lyophilisées, d'Escherichia coli peuvent être conservées à -20° pendant de nombreux mois sans perte d'activité glutaminasique, selon MEISTER, 1955 (178) ; la conservation à 5° peut s'effectuer pendant de nombreux mois, mais une solution de l'enzyme perd une activité considérable à 5° pendant trois semaines. La glutaminase (enzyme à groupement SH) est plus aisément extraite après une conservation prolongée au froid ; de plus, quand elle est purifiée, l'enzyme perd 75 pour 100 de son activité pendant une semaine à 4° ; dans un état moins purifié, son activité est conservée plus longtemps pour BOYER et Coll., en 1960 (30).

La congélation, selon TAGLIABUE, en 1958 (282) semble augmenter l'activité enzymatique de l'uréase en augmentant l'état de dispersion des colloïdes enzymatiques. D'autre part, protéine à groupement SH, elle est encore extraite de graines de haricot après congélation à -20°C , mais son extraction avec succès demande de grandes quantités de mercaptoethanol qui protège ou régénère les groupes SH d'après SHEGAL, 1966 (262).

BEHERENS, en 1939 (20) étudiant des échantillons lyophilisés a trouvé que l'arginase n'était pas endommagée et GERSH et Coll., en 1954 (85) sont arrivés aux mêmes conclusions.

L'activité de la guanine désaminase est beaucoup réduite pour ROY en 1966 (252) par congélation et lyophilisation.

L'A.T.P. phosphohydrolase a intéressé de nombreux auteurs. L'observation de STRAUB et Coll. de 1952 (275) selon laquelle l'A.T.Pase est fixée à la membrane du globule rouge, permet de penser que la conservation intégrale de la structure de la membrane cellulaire est la condition du maintien de la teneur en A.T.P. au cours de l'hémolyse. L'hémolyse, par congélation, faisant subir à la membrane des modifications de structure, amène des variations d'activité ATPasique.

KHENOKH (119) , en 1966 et SHIKAMA (264), en 1963 sont unanimes pour indiquer une dénaturation ATPasique par congélation et décongélation : l'un pense que des altérations réversibles se produisent à basse température (-78) et l'autre que le maximum de dénaturation apparaît de - 20° à - 72°C. Nous pouvons opposer à cela la thèse de SCHARFF et Coll., de 1966 (259) qui trouvent une activation du système enzymatique qui catalyse l'hydrolyse de l'A.T.P., activation qui augmente avec le temps et la température décroissante de congélation des hémolysats et des activités considérablement plus élevées qu'auparavant peuvent être obtenues de cette façon ; mais, en 1966, KHENOKH (125) révisé ses conclusions en indiquant que l'activité ATPasique est inchangée après congélation et retour à la phase liquide. Travaillant sur le plasma lyophilisé, DASTUGUE et Coll., en 1961 (54) ont dosé l'activité ATPasique qui présentait une grande stabilité après remise en solution du plasma dans la quantité théorique d'eau distillée. Une diminution de l'activité ATPasique est notée par SZWARC, 1961 (281) au niveau des greffons cornéens lyophilisés utilisés en kératoplastie. Enfin, en 1964, GOLDBLITH et Coll. (91) confirment que l'activité ATPasique des aliments lyophilisés présente une diminution à la fois à la déshydratation et à la conservation. L'évaluation de cette activité ATPasique par OGIER et Coll., en 1965 (213) dans le thymus lyophilisé, permet d'envisager une conservation de la diastase par cryodessiccation. Mais, en 1966, YASUI et Coll. (315) ont pris position pour une destruction de l'activité par lyophilisation : environ les deux tiers de la perte totale s'expliquent par déshydratation.

LYASES

Une diastase non moins importante a retenu l'attention de nombreux auteurs : il s'agit de la fructose 1-6 di phosphoaldolase. En 1960, KRONMAN et Coll. (136) affirment que l'aldolase varie systématiquement d'un muscle à l'autre par congélation. Une activité aldolasique a été appréciée en 1962 par DASTUGUE et Coll. (51) dans les levures après cryodessiccation. La même année, pour BASTIDE et Coll. (16), l'aldolase témoigne d'un pouvoir relativement stable après le dépôt de plaquettes sanguines durant une dizaine de jours et même trois semaines à - 10°C. CHILSON (39) en 1965 arrive aux mêmes conclusions que pour la lactate déhydrogénase. Alors que GERSH et Coll. (85) pensent en 1954 à une inactivation presque totale de la fructose 1-6 diphosphoaldolase, KUHLMAN, 1959 (137) et HYATT, 1960 (112) sont en accord pour déclarer intacte cette enzyme au niveau des cellules cornéennes lyophilisées de chat, de rat et de lapin pour l'un et au niveau de

greffons dermoépidermiques pour l'autre. Enfin, BALLADE et Coll. (10) ont contribué en 1964 à faire connaître la présence de l'aldolase dans le thymus lyophilisé d'agneau.

ISOMERASES et LIGASES

En 1961, aucune perte d'activité de la glucose phosphate isomérase n'est constatée par ULRICH et HEBER (294). L'influence de la congélation, pour BASTIDE et Coll., 1962 (14) et de la décongélation sur la P.H.I. diminue considérablement la faculté d'isomériser le G-6-P en F-6-P et semble nuire à l'intégrité morphologique et fonctionnelle des plaquettes sanguines. Alors que les opérations de congélation et de décongélation sont parfois mises à profit, nous indique PLAT, en 1962 (229), pour libérer les enzymes, l'activité enzymatique des préparations plaquettaires congelées à -10° est plus faible que celle observée avec les mêmes suspensions à l'état frais. Par lyophilisation d'extraits aqueux de muscle de morue, MARTIN et Coll. (171) obtinrent en 1961 une fraction protéinique soluble, qui, chromatographiée, donne une fraction P.H.I. possédant les mêmes propriétés que la P.H.I. obtenue avec d'autres sources. Etudiant le plasma lyophilisé, BASTIDE et Coll., en 1962 (15) ont découvert une constance de l'activité phosphoisomérasique. Enfin, en 1964, suivant BALLADE et Coll. (10), cette même activité diastasique s'est révélée dans le thymus lyophilisé.

L'activité hexosamine synthétase, est, selon PARRINI, 1960 (221), la mieux préservée à -25° .

Une perte d'activité des carboxylases par dessiccation est indiquée par PROSKURYAKOV, 1956 (236) et TAKAKUWA, 1958 (284), note que la co-carboxylase est stable durant la déshydratation des levures et même elle est plus stable que l'activité fermentaire pendant la conservation des levures desséchées.

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES EXPERIMENTALES

G E N E R A L I T E S

En ce début de partie expérimentale, nous voudrions exposer brièvement le mode opératoire que nous avons suivi au cours de notre expérimentation.

Nous avons travaillé, redisons-le, sur des cellules de levure "Saccharomyces cerevisiae", soumises à la cryodessiccation. Nous avons examiné leurs activités enzymatiques au cours des différentes étapes de la lyophilisation, grâce à l'obligeance des Laboratoires BIOCOTEX qui ont bien voulu nous fournir continuellement des échantillons de culture de levure prélevés à divers moments de la fabrication.

Sans entrer dans les modalités techniques des opérations qui constituent de véritables secrets de laboratoire, reprenons simplement le schéma de fabrication de l'ULTRA-LEVURE lyophilisée :

Le bouillon utilisé pour la fabrication de cette forme lyophilisée est enrichi en substances nutritives. A partir de souches mères, sont effectuées des cultures successives en milieu liquide ; les deux premières cultures (stades A et B) sont faites en ballon et les cultures suivantes (stades C, D, E, F et G) en cuves, les volumes de ces cultures croissant à chaque fois que l'on passe d'un stade à l'autre.

A partir de souches mères, sontensemencées des souches filles (A) qui serviront à ensemencer des souches petites filles (B). Le bouillon de culture a des concentrations plus importantes en éléments nutritifs. Ces souches petites filles servent à ensemencer une première cuve (stade C). Cette cuve centrifugée servira à ensemencer une deuxième cuve (D). Les stades E et F sont des cultures en cuves réalisées suivant le même mode de fabrication. La levure est centrifugée (stade G) puis remise en suspension pour effectuer la lyophilisation (H). Cette solution est congelée puis lyophilisée ; la levure est granulée (I), mélangée avec du sucre glace (J), enfin mise en gélules (K).

En résumé, les stades au cours desquels il risque d'y avoir des modifications enzymatiques vont de F à J et surtout entre les étapes G et H.

Les échantillons que nous avons reçus se présentaient en ampoules scellées de consistance tantôt liquide (A...F), tantôt pâteuse (G) puis à nouveau plus liquide (H) et enfin solide (I, J et K). Dès réception, ces échantillons ont été conservés en chambre froide à + 4°C pour éviter tout risque d'altération. Sur des dilutions effectuées dans l'eau distillée,

de ces différents stades, nous avons examiné les activités enzymatiques suivantes : aspartate amino-transférase, alanine amino transférase, phosphatase acide, β h fructofuranosidase, leucine amino peptidase, fructose diphosphate aldolase et glucose phosphate isomérase.

Nous avons dosé parallèlement les acides ribonucléique et désoxyribonucléique ainsi que les protéines par la méthode de KJELDAHL.

Après avoir terminé nos dosages enzymatiques, nous nous sommes trouvés devant le problème de l'interprétation de nos résultats, car il ne s'agissait pas tant de montrer l'activité enzymatique des levures que le devenir de cette activité au cours de la lyophilisation.

L'expression de nos résultats en pourcentage d'activité diastatique, pour une dilution donnée et pour un certain temps d'incubation, nous permettait de déceler les variations d'un stade à l'autre, mais ne nous indiquait pas si ces perturbations étaient dues à la lyophilisation ou à des différences de concentration entre les divers stades ; il nous était d'autre part assez difficile de trouver une dilution commune à tous les échantillons de façon à établir une comparaison.

Les laboratoires BIOCODEX sont venus à notre secours en nous communiquant la concentration en extrait sec de levure pure dans chaque échantillon :

- Stade F = 2 pour 100
- Stade G = 25 pour 100 - 26 pour 100
- Stade H = 22 pour 100 - 23 pour 100
- Stade I = 88 pour 100
- Stade J = 66 pour 100
- Stade K = 66 pour 100

Ceci nous a permis de calculer et d'exprimer nos résultats en μ m de substrat métabolisé par rapport à 1 g d'extrait sec pour chaque échantillon. De ce fait, nous avons pu comparer l'activité enzymatique des différents stades après lyophilisation et venir compléter expérimentalement nos recherches bibliographiques.

Sur les différents tableaux, sont portées les moyennes arithmétiques M des essais effectués pour chaque dilution et les écarts standards calculés d'après la formule :

$$\sigma = \sqrt{\frac{(M - M_x)^2}{n - 1}}$$

σ = Somme

M = Moyenne arithmétique des résultats

M_x = Résultat partiel

n = Nombre d'expériences

C H A P I T R E I

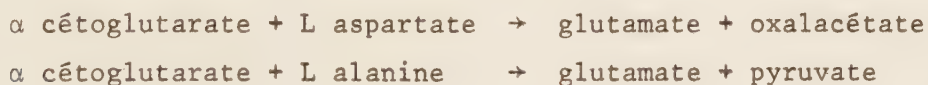
ACTIVITES AMINO TRANSFERASIQUES DE LA LEVURE

GENERALITES -

Les transaminases sont des transférases (2.6.1.) qui catalysent le transfert du groupe NH_2 de certains monopectides sur un acide cétonique provenant du métabolisme glucidique.

C'est BRAUNSTEIN et KRITZMANN (32) qui ont les premiers, en 1937, mis en évidence ces diastases dans les tissus animaux. La transamination s'applique, selon COHEN, 1939 (42) à deux réactions seulement, faisant intervenir l'acide glutamique d'une part, l'acide pyruvique et l'acide oxalacétique d'autre part.

Les activités aspartate et alanine amino transférasiques catalysent respectivement les réactions suivantes :



ROINE (250), en 1947, trouva que les groupements aminés non seulement de l'acide aspartique et de l'alanine, mais aussi de la valine, de la leucine et de l'isoleucine étaient transférés sur l'acide α céto glutarique par des extraits de levure et la spécificité des réactions de transamination dans les micro-organismes a été démontrée par des travaux variés.

Les études de BIGGER-GEHRING (24) ont permis d'indiquer que les extractats de levure catalysent seulement des réactions de transamination dans lesquelles interviennent l'acide glutamique et l'acide α céto glutarique. L'activité transaminasique est surtout grande pour l'acide aspartique, l'alanine, ainsi que pour la leucine, la norleucine, l'ornithine et les acides aminés aromatiques.

Rôle des transaminases dans la levure de bière (MARTIN, 1961)
(170) :

L'aspartase et surtout l'acide glutamique dehydrogénase constituent les principaux systèmes enzymatiques permettant la synthèse des acides aminés par les levures. Mais il semble que les transaminases, découvertes depuis lors, prédominent dans cette synthèse en tant que voies de connection entre les métabolismes glucidique et protidique. Le cycle de KREBS existe dans les levures où toutes ses réactions ont été mises en évidence et de plus des particules respiratoires semblables aux mitochondries ont été isolées des cellules par LINNANE et STILL (150).

DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE -

Nous avons utilisé la méthode de REITMAN et FRANKEL de 1957 (239) qui a été employée dans ce laboratoire par DASTUGUE, BASTIDE et Coll., en 1959 (52) et que nous avons adapté au cas de la levure de bière.

Principe :

Après incubation du substrat à 37°C, en présence de l'enzyme, en milieu tampon phosphate 0,1 M de pH = 7,4, les hydrazones de l'oxalacétate ou du pyruvate formés à partir d'une solution d' α cétooglutarate à 2 mM par litre, sont dosés par photolorimétrie à 505 m μ .

Réactifs :

- Solution de substrat G.O.T. : (α cétooglutarate 2 mM p.L. et dL-aspartate 200 mM p.L.). Triturer au mortier pendant 5 à 10 minutes, dans 15 ml environ de soude N : 2,66 g d'acide dL-aspartique et 0,0292 g d'acide α cétooglutarique et ceci jusqu'à dissolution totale. Ajuster le pH à 7,4, transvaser dans un ballon jaugé de 100 ml et compléter à 100 ml avec la solution tampon. Répartir en flacons de polythène et conserver à - 25°C.
- Solution de substrat G.P.T. : (α cétooglutarate 2 mM par L. et dL-alanine 200 mM par L.). Triturer au mortier pendant 5 à 10 minutes, dans 2 ml environ de soude N : 1,78 g de dL-alanine et 0,0292 g d'acide α cétooglutarique et ceci jusqu'à dissolution totale. Ajuster le pH à 7,4 et transvaser dans un ballon jaugé de 100 ml et compléter à 100 ml avec la solution tampon. Répartir en flacons de polythène et conserver à - 25°C.
- Solution tampon de phosphates 0,1 M de pH = 7,4, selon SOERENSEN : mélanger en proportions convenables $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ à 13,7 g.p.l. (80 ml) et PO_4HNa_2 , 12 H_2O à 35,81 g.p.l. (420 ml).² Conserver à + 4°C.
- Solution 2-4 dinitrophénylhydrazine (2-4 DNPH) à 19,8 mg pour 100 ml de HCl. Conserver à l'abri de la lumière et à + 4°C
- Solution étalon de pyruvate de sodium à 22 mg pour 100 ml de solution tampon phosphate. A préparer extemporanément.
- Solution de soude 0,4 N. Conserver à + 4°C.

Mode opératoire :

Préparer deux témoins, pour chaque dosage :

- Témoin n° 1 : (réglage du calorimètre) : 1,25 ml de solution tampon phosphate + 1,25 ml de substrat + 0,5 ml d'eau distillée.
- Témoin n° 2 : (coloration donnée par la présence éventuelle d'oxalacétate ou de pyruvate) : 1,25 ml de solution tampon + 1,25 ml de substrat + 0,5 ml de préparation enzymatique.

Ces deux témoins ne sont pas mis à incuber.

Faire incuber pendant demi-heure et une heure au bain-marie à 37° :

- Essai : (hydrolyse enzymatique) : 1,25 ml de solution tampon + 1,25 ml de substrat + 0,5 ml de préparation enzymatique.
- Témoin n° 3 : (hydrolyse spontanée) : 1,25 ml de solution tampon + 1,25 ml de substrat + 0,5 ml d'eau distillée.

A la fin de l'incubation, ajouter dans tous les tubes 1 ml de solution d'acide trichloracétique à 8 pour 100. Centrifuger. Prélever 3 ml de surnageant et ajouter 1 ml de 2-4 dinitrophénylhydrazine à 0,198 g par litre dans HCl N. Laisser 20 minutes à la température du laboratoire. Ajouter 8 ml de soude 0,4 N. Laisser 30 minutes à la température du laboratoire puis apprécier la coloration à 505 mμ au photocalorimètre.

Etalonnage :

L'étalonnage est effectué à l'aide d'une solution de pyruvate de sodium, dont les volumes de 0-0,1...0,9 1 ml additionnés de 1-0,9...0,1-0 ml de substrat, de 1 ml de solution tampon et de 0,4 ml d'eau distillée, correspondent respectivement à 0-10...90 pour 100 d'hydrolyse.

Résultats :

Nous avons donné dans le tableau I l'activité aspartate amino transférase en pourcentage de substrat métabolisé pour trois dilutions et pour deux temps d'incubation 30 et 60 minutes. Dans le tableau I', nous avons exprimé de la même manière les résultats obtenus pour l'alanine amino transférase.

Enfin, dans le tableau I'', les activités amino transférasiques sont données en μM de substrat métabolisé/1 g d'extrait sec, en demi-heure et au un dixième. C'est grâce à ce tableau que nous pourrions établir nos conclusions.

Nous constatons tout d'abord une teneur à peu près égale en GOT et GPT pour l'échantillon G, puis une diminution légère entre G et H et qui s'étend progressivement jusqu'au stade K.

La diminution de l'activité est de 28 pour 100 pour la GOT, entre les stades G et H, c'est-à-dire avant et après lyophilisation, mais elle s'accroît beaucoup ensuite pour aboutir à 70 pour 100 pour le stade K. Il en est pratiquement de même pour la GPT.

Cette diminution d'activité n'incombe pas totalement à la lyophilisation, mais dépend très certainement de l'autolyse d'une part et de la destruction enzymatique par les micro-organismes capables de modifier nos résultats en accélérant la destruction enzymatique pour les échantillons non conservés en ampoules scellées, d'autre part.

Tableau I

ACTIVITE ASPARTATE AMINO TRANSFERASIQUE GOT

Pourcentage de substrat métabolisé

Echantillons	Dilutions	Incubation			
		30'		60'	
		M	σ	M	σ
F	1/5	12,5	1,40	17,8	1,02
	1/10	2,7	1,13	6,3	1,75
G	1/10	21,5	2,05	27	3,05
	1/50	5,5	1,35	6,7	2
	1/100	2,7	0,99	4,1	0,70
H	1/10	37,1	3,50	37,5	2,24
	1/50	11	2,10	16,1	1,10
	1/100	7,1	1,07	10,1	1,02
I	1/10	28	1,58	40,1	3,26
	1/50	14,5	2,38	26,6	1,76
	1/100	11	3	19	2,58
J	1/10	27	1,89	44,6	4,10
	1/50	12	1,06	18,2	0,75
	1/100	8,5	0,96	14	2,24
K	1/10	30,4	2,80	40,7	3,38
	1/50	12,1	2,66	19,5	1,41
	1/100	8,4	1,39	14,2	0,75

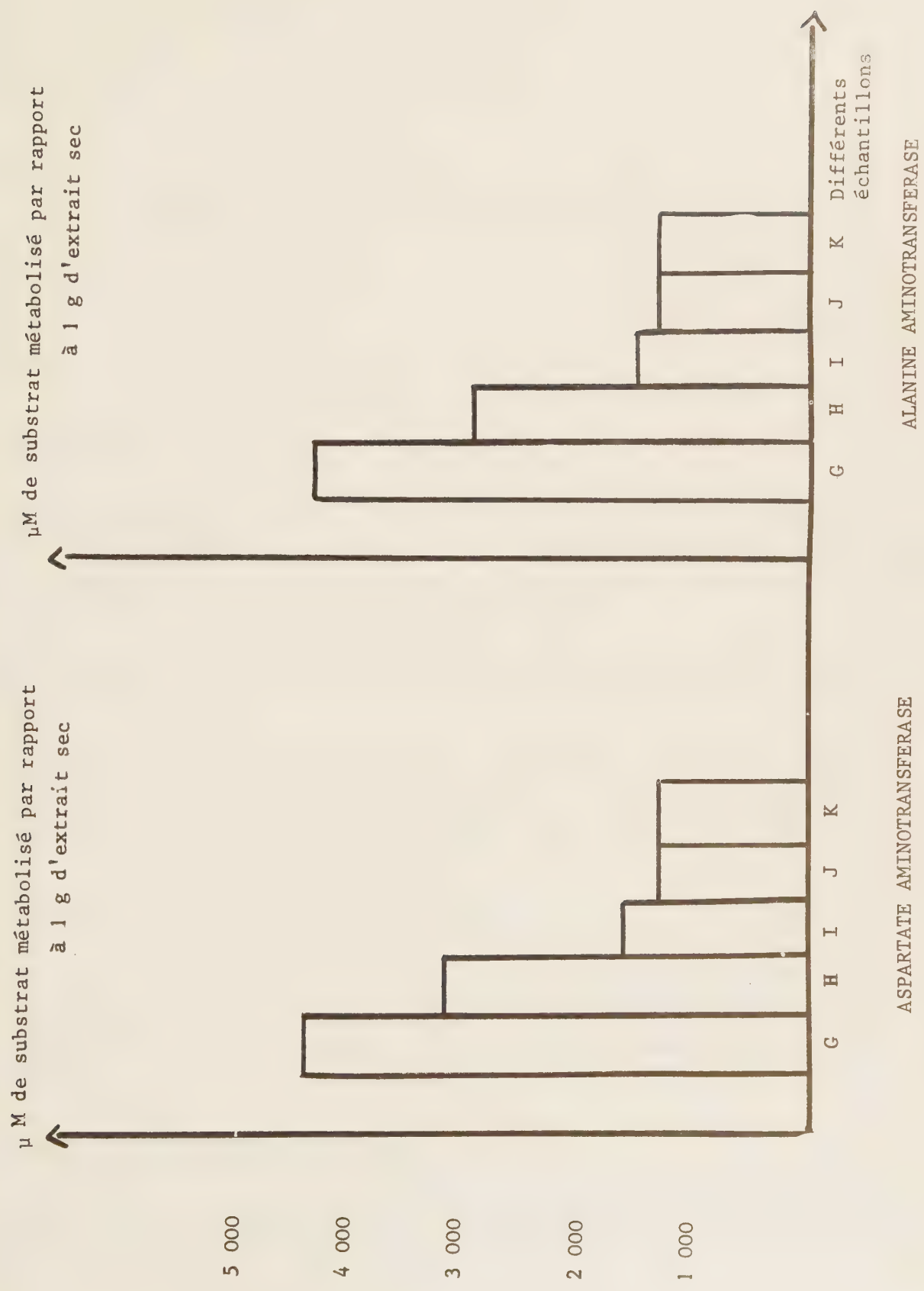
Tableau I'ACTIVITE ALANINE AMINO TRANSFERASIQUE G.P.T.

Echantillons	Dilutions	Incubation			
		30'		60'	
		M	σ	M	σ
F	1/2	16,4	0,73	26	2
	1/5	6,9	1	12	2,17
	1/10	3,8	1,06	6,6	1,01
G	1/10	21,5	2,80	23	2,90
	1/50	5,8	1	8,1	1,40
	1/100	3	0,90	5	1,01
H	1/10	32,6	3,90	35	4,01
	1/50	9,9	1,90	14,6	2,40
	1/100	7	1,50	10,6	1,50
I	1/10	25,7	3,90	38,7	5,60
	1/50	7,9	2,00	13,2	3,02
	1/100	4,4	2,14	8,1	2,90
J	1/10	20	1,25	27,3	1,24
	1/50	7	1,17	9,7	1,34
	1/100	4	0,78	6	0,96
K	1/10	22	3,14	25,7	2,04
	1/50	8,2	1,61	10,2	1,83
	1/100	3,7	1,20	6	1,83

Tableau I''ACTIVITE AMINO TRANSFERASIQUE

Echantillons	Extrait sec en pour 100	G O T	G P T
		En μ M de substrat métabolisé /1 g d'extrait sec	
G	25	4 420	4 300
H	22	3 180	2 940
I	88	1 600	1 457
J	66	1 345	1 272
K	66	1 345	1 272

SCHEMA N° 1 -



C H A P I T R E I I

ACTIVITE PHOSPHATASIQUE ACIDE DE LA LEVURE

GENERALITES -

Les phosphatases sont des phosphomonoestérases qui catalysent l'hydrolyse des monoesters de l'acide orthophosphorique en acide phosphorique et en alcool ou phénol. Jouant un rôle important dans la fermentation alcoolique, elles ont donné lieu à un certain nombre de travaux (70, 248, 257). Plusieurs types d'enzymes ont été distingués :

- Phosphatase de type I ou phosphatase alcaline (3.1.3.1.) de pH optimum voisin de 8,0-9,0 et très répandue dans les tissus animaux. (48, 114).

- Phosphatases acides dont la plus connue est la phosphatase de type II (3.1.3.2.) caractérisée par un pH optimum de 5,0-5,6 ; sa répartition est plus répandue mais plus irrégulière ; c'est l'enzyme caractéristique des tissus animaux, mais aussi des tissus végétaux chlorophylliens, des plantes, des levures et des bactéries.

La levure de bière renferme à la fois la phosphomonoestérase I et la phosphomonoestérase II, selon SCHAFFNER et Coll., 1938 (248).

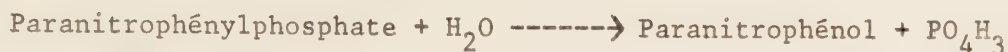
Nous avons dosé l'activité enzymatique de la phosphatase acide dans les levures car, en ce qui concerne la phosphatase alcaline, bien qu'elle soit présente dans les levures, elle ne l'était pas en quantité suffisante dans nos échantillons pour permettre un dosage correct de son activité.

DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE -

L'activité phosphatasique est appréciée selon la technique de BESSEY, LOWRY et BROCK de 1946 (23) utilisée par BAUDON et Coll., 1961 (18).

Principe :

Le paranitrophénylphosphate, incolore, libère à 37°C par hydrolyse du groupement phosphate, du paranitrophénol, coloré en jaune en milieu alcalin.



Selon le pH du milieu d'incubation, nous apprécions l'activité phosphatasique acide ou alcaline.

Réactifs :

- Solution de substrat : solution de paranitrophénylphosphate de sodium M/1 000 à 26,3 mg pour 100 ml d'eau distillée. A préparer extemporanément.
- Solution de paranitrophénol M/2 000 pour l'étalonnage, à 13,9 mg pour 200 ml d'eau distillée. A préparer extemporanément.
- Solution de tampon citrique de pH = 4,8 :
 - . Acide citrique 21,008 g
 - . NaOH N 200 ml
 - . Eau distillée qsp. 1 000 ml

Conserver à + 4°C.

- Solution de soude 0,2 N. Conserver à + 4°C.

Mode opératoire :

Préparer les témoins :

- Témoin n° 1 : (réglage du spectrophomètre), 1 ml d'eau distillée + 10 ml de soude 0,2 N, non incubé.
- Témoin n° 2 : (activité spontanée) 1 ml du mélange à parties égales et extemporanées de la solution de tampon citrique et de la solution de substrat M/1 000 et 0,1 d'eau distillée. Faire incubé pendant demi-heure et une heure et continuer le dosage selon le protocole habituel.

Faire les essais enzymatiques de la phosphatase acide : 1 ml du mélange à parties égales et extemporanées de la solution de tampon citrique et de la solution de substrat M/1 000 et 0,1 ml de la préparation enzymatique.

Laisser incubé à 37°C pendant demi-heure et une heure, puis ajouter dans les tubes 10 ml de la solution de soude 0,2 N ; la réaction est ainsi stoppée et la coloration développée. La lecture se fait au spectrophotomètre JOUAN, type Junior à 410 mμ.

Etalonnage :

L'étalonnage est effectué à l'aide d'une solution de paranitrophénol M/2 000, dont les volumes de 0-0,1...0,9-1 ml additionnés de 1,1-1...0,1 ml d'eau distillée et de 10 ml de solution de soude 0,02 N, correspondent à 0-10...90 pour 100 d'activité.

Résultats :

Dans les tableaux n° II et II', nous avons rassemblé nos résultats expérimentaux concernant l'activité phosphatasique acide de la même manière que pour les transférases. Dans le tableau n° II, les résultats sont en pourcentage de substrat métabolisé pour chaque dilution et chaque temps d'incubation alors que dans le tableau II', ils se trouvent en μM de substrat métabolisé par rapport à 1 g d'extrait sec.

Nous remarquons que la diminution d'activité est seulement de 1 pour 100 entre G et H ; nous pouvons donc parler, sans doute, d'une bonne stabilité de cette enzyme à la lyophilisation, stabilité qui décroît au cours des derniers stades, indépendants de la cryodessiccation.

Tableau II

ACTIVITE PHOSPHATASIQUE ACIDE
Pourcentage de substrat métabolisé

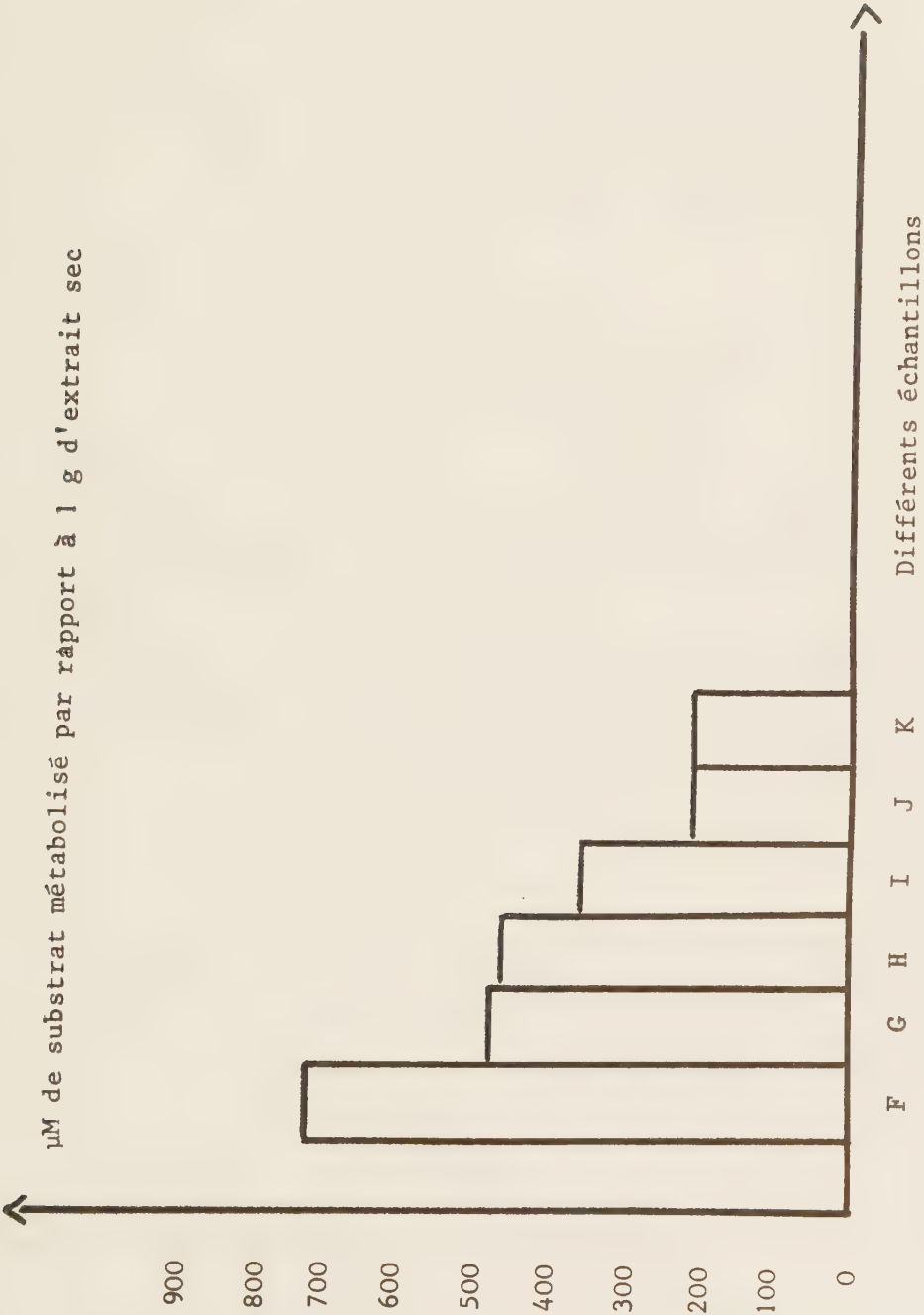
Echantillons	Dilutions	I n c u b a t i o n			
		30'		60'	
		M	σ	M	σ
F	1/10	18,2	1,24	30,2	2,05
	1/50	4,2	1,30	7,5	0,81
	1/100	2,9	0,97	5	1,46
G	1/50	39,2	2,01	45,6	4,10
	1/100	23,8	0,98	28,8	1,69
H	1/50	36,1	1,79	44,1	1,43
	1/100	20,5	1,20	26,2	4,40
I	1/100	63,3	2,73	75,5	1,82
	1/500	18,2	1,25	25	0,70
	1/1000	14,8	3,16	19	4,50
J	1/100	26,9	2,46	42	4,90
	1/500	8,7	1,46	13,3	3,15
	1/1000	5,4	1,14	7,8	1,10
K	1/100	27	1,14	33	2,56
	1/500	8,4	1,34	8,6	1,50
	1/1000	5,2	3,56	5,7	0,66

Tableau II'

ACTIVITE PHOSPHATASIQUE ACIDE

Echantillons	Extrait sec en pour 100	μ M de substrat métabolisé /1 g d'extrait sec
F	2	725
G	25 - 26	476
H	22 - 23	466
I	88	360
J	66	205
K	66	205

SCHEMA N° 2 -



PHOSPHATASE ACIDE

C H A P I T R E III

ACTIVITE β h FRUCTOFURANOSIDASIQUE DE LA LEVURE

(Invertase)

GENERALITES -

La β h fructofuranosidase (3.2.1.26) ou invertase de la levure est une hydrolase agissant sur les composés glycosyl (3.2) en hydrolysant les glycosides (3.2.1).

C'est la découverte par DUMAS et BOULLAY (69), en 1828, du rôle d'une molécule d'eau dans la fermentation du saccharose par la levure qui permet de mettre en évidence l'activité invertasique.

La réaction chimique catalysée par l'enzyme peut s'écrire :



Dans les levures de bière et de boulangerie, Von EULER (75) a trouvé deux types de diastases suivant que l'une ou l'autre des extrémités fructose ou glucose de la molécule est attaquée :

- Fructosidase ou invertase de la levure,
- Glucosidase ou taka diastase.

Retenons des nombreux travaux faits à ce sujet (127, 304, 305), ceux de WINGE et ROBERTS (308, 204, 311) qui permettent de distinguer grâce aux génotypes dans les cellules de levure :

- Les gènes R_1 , R_2 , R_3 responsables de la synthèse d'une β h fructofuranosidase,

- Le gène M_1 permettant la synthèse d'une α glucosidase,

- Le gène M_2 favorisant celle d'une maltase spécifique. La levure contiendrait ces trois sortes d'enzymes mais au pH optimum de l'invertase (pH = 4,8), la β h fructofuranosidase est la seule qui agit sur le saccharose.

DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE -

Deux techniques ont été associées :

- Une incubation selon le système proposé par FISCHER et KOHTES (77),

- Un dosage des sucres réducteurs par la microméthode de NELSON et KING et GARNER (131) utilisée dans le laboratoire par DASTUGUE, BASTIDE et MARTIN en 1962 (51).

Principe :

L'invertase de la levure scinde le saccharose en α glucose et β fructose. Le substrat est incubé à 20°C en présence de la préparation enzymatique en milieu tamponné et à pH = 4,8. La réaction est stoppée par les réactifs I et II. On centrifuge. Avec le réactif III, on détermine à ébullition le pouvoir réducteur d'une partie aliquote du centrifugat. On obtient enfin la coloration avec le réactif IV : l'arséniomolybdate d'ammonium réagit avec l'oxyde cuivreux obtenu lors de la réduction et donne une coloration allant du jaune au bleu qui a un maximum d'absorption à 600 m μ .

Réactifs :

- Substrat : solution de saccharose 0,01 (soit 3,42 g par l) dans un tampon acétoacétique à pH = 4,8.

- Tampon : est préparé en mélangeant :

- . 45 ml de CH₃ COOH à 12 g par l.
- . 55 ml de CH₃ COO Na à 27,2 g par l.

- Réactif I de NELSON : (défécation)

- . Sulfate de sodium sec..... 12 g
- . Sulfate de cuivre cristallisé..... 6 g
- . Eau distillée Q.S.P..... 100 ml

- Réactif II de NELSON (déprotéinisation)

- . Tungstate de sodium..... 10 g
- . Eau distillée Q.S.P..... 100 ml
- (Conserver à la glacière à + 4°)

- Réactif III de NELSON (réducteur)

- . Solution A : Sulfate de cuivre cristallisé.. 13 g
- Eau distillée Q.S.P..... 1 000 ml
- . Solution B : Carbonate acide de sodium..... 50 g
- Eau distillée..... 700 ml

Dissoudre puis ajouter :

. Carbonate de sodium anhydre..... 40 g

Préparer d'autre part par dissolution à 60° :

. Oxalate neutre de potassium..... 36,8 g

. Eau distillée..... 120 ml

Mélanger et ajouter la solution suivante :

. Bitartrate de sodium et de potassium..... 24 g

. Eau distillée..... 100 ml

Compléter à 1 000 ml avec de l'eau distillée.

Mélanger A et B extemporanément à parties égales.

- Réactif IV de NELSON : (coloration)

. Molybdate d'ammonium..... 25 g

. Eau distillée..... 450 ml

Dissoudre et ajouter :

. Acide sulfurique concentré et pur..... 21 ml

Préparer d'autre part :

. Arséniate disodique cristallisé..... 3 g

. Eau distillée..... 25 ml

Mélanger, laisser séjourner 24 ou 48 heures puis conserver à la glacière à + 4°.

Mode opératoire :

Prélever dans un tube à essai :

1 ml de solution de saccharose à 0,01 M dans le tampon +

1 ml de préparation enzymatique

Laisser 4 heures et demie et 6 heures au thermostat à 20°C.

Dans des tubes à centrifuger, prélever rapidement 0,1 ml de solution réductrice à doser (à l'aide d'une micropipette) et ajouter 3,7 ml de Réactif I. Laisser en contact 10 mn puis ajouter 0,2 ml de Réactif II. Mélanger et centrifuger.

- Centrifugat : 1 ml

- Réactif III : 1 ml

Porter au B.M. bouillant 10 mn très exactement. Refroidir sous un courant d'eau froide. Ajouter 1 ml de Réactif IV ; agiter et compléter à 10 ml avec de l'eau distillée. Agiter puis apprécier la coloration au photolorimètre à 600 mμ.

Pour chaque dosage, il faut faire deux témoins :

1°/ 1 ml de substrat +
1 ml d'eau distillée

Doser selon le protocole précédent ; ce tube permet d'éliminer l'hydrolyse spontanée ; celle-ci a toujours été nulle.

2°/ 1 ml d'eau distillée +
1 ml de préparation enzymatique

Doser selon le protocole précédent ; ce tube permet d'éliminer l'erreur due à la présence de corps réducteurs dans la substance à tester et due aux corps réducteurs qui pourraient prendre naissance au cours de l'incubation.

Etalonnage :

Les corps réducteurs à doser sont le glucose et le fructose, produits en quantité égale à partir du saccharose. L'étalonnage du colorimètre se fait avec une solution à pH = 4,8 de glucose 0,01 M et de fructose 0,01 M. On a donc une solution réductrice 0,02 M.

Dans une série de tubes, on mélange cette solution réductrice et le substrat de façon à avoir une concentration en sucres réducteurs allant de 0 à 100 pour 100. Dans chaque tube on prendra 1 ml, on ajoute 1 ml d'eau distillée et on dose selon le protocole précédent. Passer au photolorimètre à 600 mμ. Etablir le zéro avec le tube qui ne contient pas de sucres réducteurs.

Résultats :

Les résultats relatifs à l'activité invertasique sont résumés en pourcentage de substrat métabolisé dans le tableau III et en μM de substrat métabolisé/1 g d'extrait sec pour 4 heures et demie d'incubation dans le tableau III'.

Nous sommes surpris par l'**excellente** stabilité de cette diastase aux différentes opérations de lyophilisation.

Nous ne remarquons pas de diminution d'activité au cours des derniers stades, due à l'autolyse et à la destruction enzymatique par les micro-organismes, comme pour les enzymes précédentes. En effet, dans ce cas, l'autolyse bien que faible exerce une activation sur l'invertase qui l'emporte sur la destruction enzymatique.

Tableau III

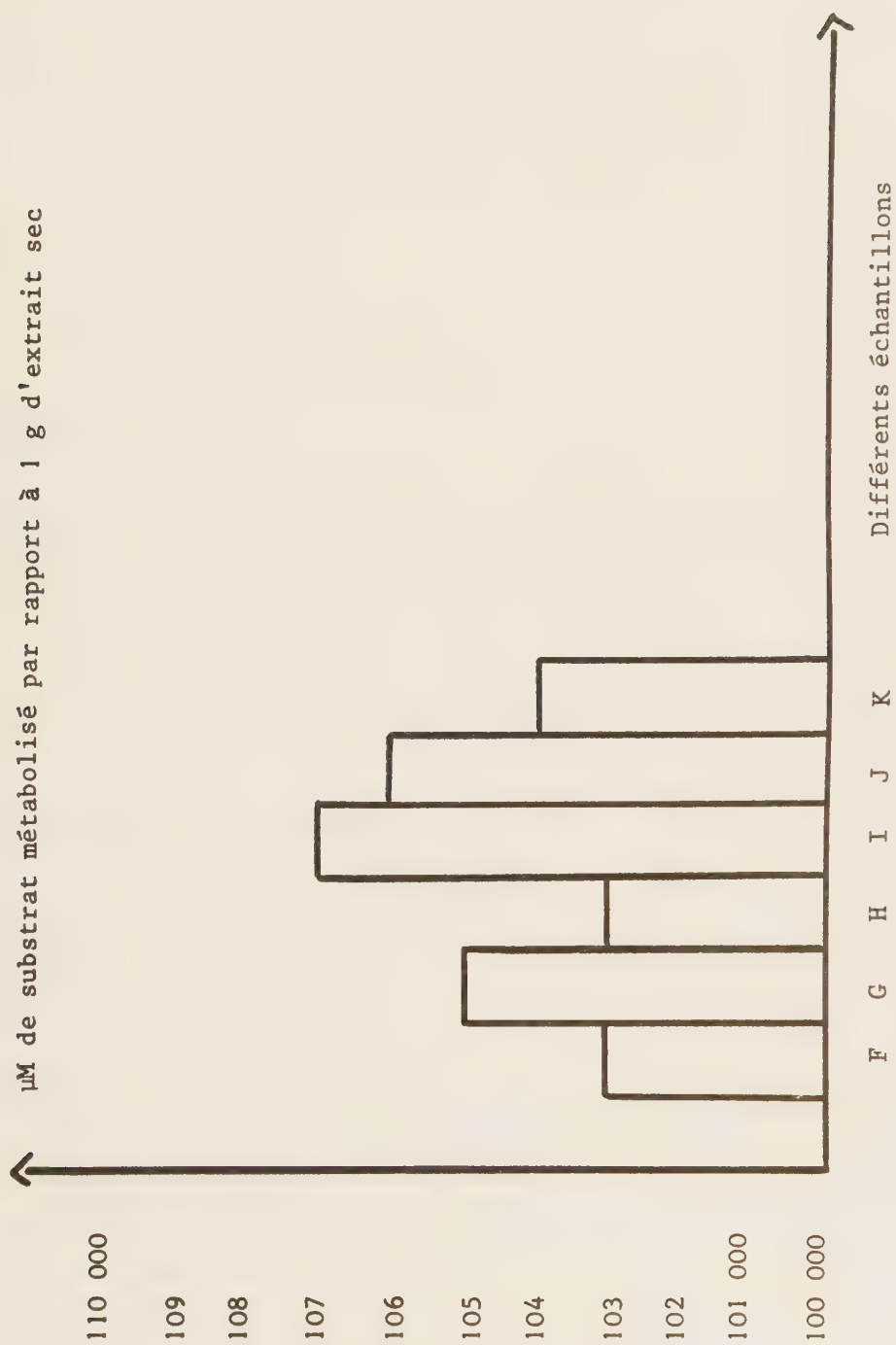
ACTIVITE β h FRUCTOFURANOSIDASIQUE

Hydrolyse pour cent du saccharose

Echantillons	Dilutions	I n c u b a t i o n			
		4 $\frac{1}{2}$ h		6 h	
		M	σ	M	σ
A	1/250	14,3	3,55	25,6	4,27
	1/500	6,3	1,58	9,5	1,87
	1/1000	1,9	1,12	6,2	2,63
B	1/125	26,0	1,41	30,0	1,44
	1/250	16,8	3,40	18,2	2,14
	1/500	9,8	0,75	13,5	3,41
C	1/125	19,8	3,50	23,8	1,52
	1/250	10,3	2,33	13,0	1,41
	1/500	5,5	1,09	7,0	1,64
D	1/125	42,0	3,08	52,8	3,08
	1/250	25,5	2,18	33,2	2,64
	1/500	11,9	1,18	16,2	2,33
	1/1000	11,3	2,30	13,5	2,07
E	1/500	25,0	1,94	31,1	3,50
	1/1000	14,2	1,69	19,0	1,14
	1/2500	7,2	2,85	9,3	2,89
F	1/500	41,5	1,92	43,8	4,10
	1/1000	23,7	2,28	30,0	1,73
	1/2500	14,1	1,69	17,0	2,94
	1/5000	9,5	1,12	13,5	1,50
G	1/5000	41,0	1,41	47,0	3,16
	1/10000	32,0	1,41	36,5	1,44
	1/25000	15,0	1,26	20,0	1,00
H	1/5000	39,7	1,71	41,2	2,33
	1/10000	23,7	2,30	29,7	1,48
	1/25000	13,8	1,57	18,6	2,71
I	1/25000	38,6	2,12	44,3	1,10
	1/50000	18,7	1,39	26,7	1,82
	1/100000	9,1	1,62	13,2	1,92
J	1/25000	27,0	3,02	34,5	2,55
	1/50000	14,8	1,16	23,4	2,88
	1/100000	5,3	1,00	7,4	1,14
K	1/25000	28,3	1,85	33,3	1,97
	1/50000	15,5	1,26	25,5	1,50
	1/100000	6,8	1,05	8,8	1,13

Tableau III'ACTIVITE β h FRUCTOFURANOSIDASIQUE

Echantillons	Extrait sec en pour 100	μ M de substrat métabolisé /1 g d'extrait sec
F	2	103 000
G	25	105 000
H	22	103 000
I	88	107 000
J	66	106 000
K	66	104 000



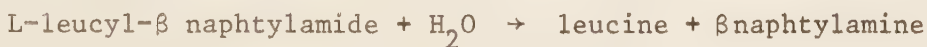
β h FRUCTOFURANOSIDASE

C H A P I T R E I V

ACTIVITE LEUCINE AMINO PEPTIDASIQUE

GENERALITES -

La leucine amino peptidase (3.4.1.1.) est une hydrolase des α amino acyl peptides (3.4.1.). Sa présence a été décelée dans de nombreux tissus animaux et végétaux et en particulier dans les levures. Capable d'hydrolyser un grand nombre d'amides et de peptides, elle catalyse in vitro, la réaction suivante :



DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE -

L'activité leucine amino peptidasique est appréciée suivant la technique de GOLDBARG et RUTENBURG de 1958 (90), quelque peu modifiée par RUTENBURG et Coll. (253).

Principe :

La quantité de β naphtylamine libérée par hydrolyse de la L-leucyl- β naphtylamide est proportionnelle à l'activité de la L.A.P. Cependant, puisque cette substance n'est pas colorée, il faut la diazoter et ensuite elle réagit avec une base colorée, la N-Naphtyl-Ethylène diamine, pour former une coloration pourpre, proportionnelle à la quantité de β naphtylamine qui a été formée.

Réactifs :

- Solution de tampon phosphate : 0,2 M de pH = 7

Mélanger en proportions convenables :

• $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ sec à 27,4 g/l.....	40 ml
• PO_4HNa_2 , 12 H_2O à 71,6 g/l.....	60 ml

Conserver à + 4°.

- Solution de L-leucyl- β -naphtamide HCl : $3,425 \cdot 10^{-4}\text{M}$ (PM = 292,7). Préparer une solution aqueuse de ce chlorhydrate à 0,2 mg par ml et mélanger à volume égal avec le tampon phosphate. Conserver à - 25°.
- Solution aqueuse de nitrite de sodium : à 0,1 pour 100. Préparer quotidiennement la solution dans l'eau distillée glacée.
- Solution aqueuse de sulfamate d'ammonium : à 0,5 pour 100. Conserver à + 4°C.
- Solution de chlorhydrate de N-Naphtyl-Ethylène diamine : à 0,05 pour 100 dans l'éthanol à 95°. Conserver à + 4° dans un flacon en verre coloré.
- Solution d'acide trichloracétique : à 15 pour 100. Conserver à + 4°C.
- Solution de β naphtylamine pour étalonner à $3,425 \cdot 10^{-4}\text{M}$ (PM = 143,2). Préparer une solution mère : 49,04 mg de β naphtylamine + 50 ml d'éthanol à 95° + eau QSP 100 ml. La solution aqueuse à 4,90 mg pour 100 ml s'obtient par dilution au 1/10e de la solution mère. A préparer extemporanément.

Mode opératoire :

Préparer les témoins non incubés :

- Témoin n° 1 : (réglage du photolorimètre) : 1 ml de tampon phosphate + 1 ml d'eau distillée.
- Témoin n° 2 : (substances diazotables de la préparation enzymatique) : 1 ml de solution tampon phosphate + 1 ml de préparation enzymatique.

Faire ensuite incuber demi-heure et une heure, dans un bain-marie à + 37° :

- Chaque essai (hydrolyse enzymatique) : 1 ml de préparation enzymatique + 1 ml de substrat $0,425 \cdot 10^{-4}\text{M}$.
- Témoin n° 3 : (hydrolyse spontanée) : 1 ml d'eau distillée + 1 ml de substrat $3,425 \cdot 10^{-4}\text{M}$.

Au terme de cette incubation, ajouter à tous les tubes 1 ml d'acide trichloracétique à 15 pour 100 pour stopper la réaction. Agiter et centrifuger. Prélever 1 ml de surnageant et ajouter successivement à la température du laboratoire :

- 1 ml de nitrite de sodium 0,1 pour 100. Agiter, repos 3 minutes.
- 1 ml de sulfamate d'ammonium à 0,5 pour 100. Agiter, repos 2 minutes.

- 2 ml de solution alcoolique de N-Naphtyl-éthylène-diamine à 0,05 pour 100. Agiter et laisser reposer 20 à 60 minutes à l'obscurité et à la température du laboratoire (20°). Lire à 560 mμ.

Etalonnage :

Il est pratiqué avec la solution de β naphthylamine $3,425 \cdot 10^{-4} M$ dont les volumes de 0 - 0,1... 0,9 - 1 ml additionnés de 1 - 0,9... 0,1 - 0 ml d'eau distillée sont mis à la place du substrat et correspondent respectivement à 0 - 10... 90 pour 100 d'hydrolyse.

Résultats :

Toujours de la même manière, nous avons présenté nos résultats dans les tableaux IV et IV'.

Que se passe-t-il entre les stades G et H qui nous intéressent plus particulièrement. L'activité passe de 137 μM de substrat métabolisé /1 g d'E.S. pour G à 134 pour H et 132 pour I. La diminution d'activité, si elle existe, s'avère être de 3 pour 100 ; on peut donc considérer que la L.A.P. présente une bonne stabilité à la lyophilisation bien qu'elle diminue légèrement ensuite dans les derniers stades.

Tableau IV

ACTIVITE LEUCINE AMINO PEPTIDASIQUE

Echantillons	Dilutions	Incubation (minutes)			
		30'		60'	
		M	σ	M	σ
A	1/10	4,9	0,68	7,3	0,96
	1/50	2,7	1,01	3,3	0,88
	1/100	1,1	0,84	1,8	0,72
B	1/10	12	2,20	18,1	3,12
	1/50	5,3	0,79	8,7	1,09
	1/100	2,7	1,01	6,1	1,12
C	Pure	0		0	
D	1/10	27,0	1,41	43,3	2,91
	1/50	8,5	1,12	15,0	1,75
	1/100	3,2	0,85	10,0	2,34

.....

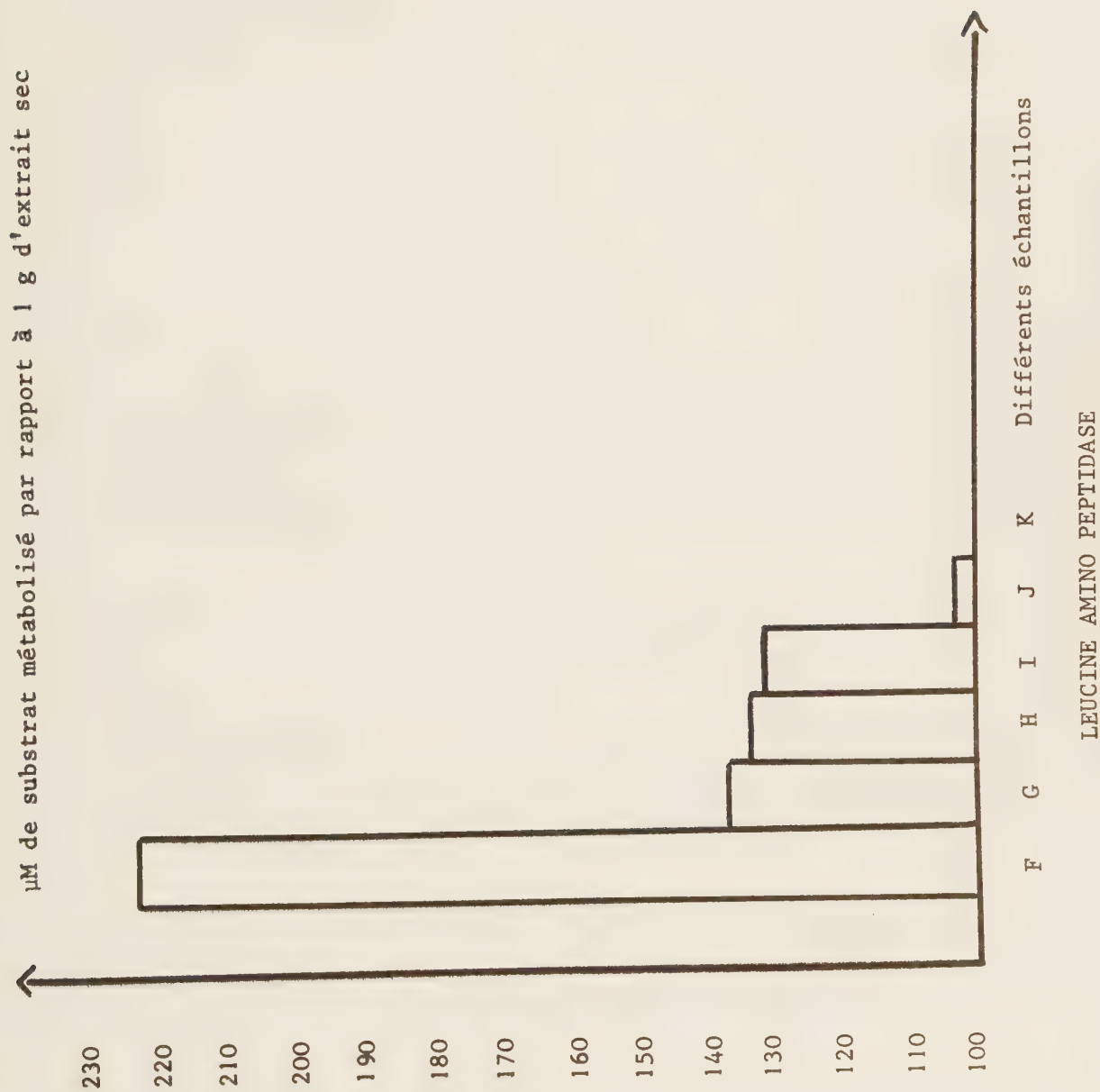
Tableau IV (suite) -

Echantillons	Dilutions	Incubation (minutes)			
		30'		60'	
		M	σ	M	σ
E	1/10	15,3	1,20	26,1	0,79
	1/50	5,6	0,95	9,3	1,09
	1/100	3	0,91	5,6	0,98
F	1/100	4,1	0,68	9,0	1,08
	1/500	2,5	0,70	4,7	1,06
	1/1000	1,3	1,01	3,5	0,90
G	1/1000	10,0	1,14	19,0	1,35
	1/2500	4,3	0,97	7,0	0,77
	1/5000	3,1	0,71	6,0	1,22
H	1/1000	9,5	1,04	13,8	1,06
	1/2500	4,0	1,13	6,0	1,14
I	1/1000	34,6	1,90	55,0	5,7
	1/2500	23,3	2,69	37,0	2,45
	1/5000	8,7	1,30	12,7	1,09
	1/10000	4,8	0,73	7,0	1,14
J	1/1000	19,8	4,65	37,6	3,28
	1/5000	3,9	0,84	5,1	0,68
	1/10000	2,3	0,78	3,7	1,09
K	1/1000	19,5	1,80	37,90	4,05
	1/5000	4,0	1,29	6,0	1,15
	1/10000	3,0	0,64	5,0	0,91

Tableau IV'

ACTIVITE LEUCINE AMINO PEPTIDASIQUE

Echantillons	Extrait sec en pour 100	μ M de substrat métabolisé /1 g d'extrait sec
F	2	224
G	25	137
H	22	134
I	88	132
J	66	103
K	66	101

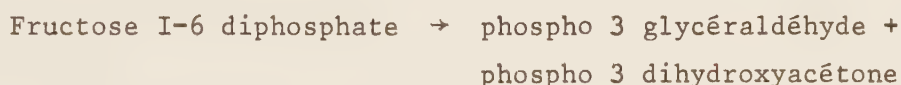


C H A P I T R E V

ACTIVITE FRUCTOSE I-6 DIPHOSPHOALDOLASIQUE DE LA LEVURE

GENERALITES -

L'aldolase (4.1.2.13) est une carbolyase très répandue dans la biosphère ; elle fut découverte pour la première fois par MEYERHOF et LOHAMN (184) et isolée du muscle par WARBURG et CHRISTIAN (300). Elle décompose, sans intervention de l'eau, les hexosephosphates en une molécule de triosephosphate et une autre molécule ; la réaction catalysée est la suivante :



En 1908, HARFEN et YOUNG (107) mettent en évidence l'existence d'hexose dephosphates dans la cellule de levure au cours de la fermentation alcoolique. En 1932, FISCHER et BAER (77) publient une synthèse du glycéraldéhyde 3 phosphate et montrent que le composé droit est facilement fermenté dans les levures.

L'aldolase de levure est différente de l'aldolase musculaire ; une purification de l'enzyme de levure a été faite par WARBURG et CHRISTIAN (300) en 1943 ; ce n'est qu'une préparation de la diastase brute ayant 5 pour 100 de l'activité de l'enzyme musculaire et qui paraît être une métalloprotéine.

DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE -

Nous avons utilisé la technique de SIBLEY et Coll. (265) reprise par SCHAPIRA et Coll. (258) et employée dans notre laboratoire par DASTUGUE et Coll. (51).

Principe :

L'aldolase scinde la fructose diphosphate en deux triosephosphates selon la réaction déjà citée.

Le substrat est incubé à 25°C, en présence de l'enzyme en milieu tamponné à pH = 7,2 (température et pH ayant été trouvés optima par DOUNCE (64) et PASQUIER (223).

On opère en présence de sulfate d'hydrazine qui fixe sous forme d'hydrazones, les trioses phosphates libérés sous l'action de l'aldolase et empêche l'action de l'isomérase qui est souvent irrégulière (la phosphodihydroxyacétone donne une coloration plus accentuée que la phosphoglycéraldéhyde, avec les réactifs servant à doser les trioses). La réaction est ensuite stoppée par l'acide trichloro acétique, ou centrifuge, ou alcalinise une partie aliquote du défécât, transformant ainsi les trioses en méthylglyoxal et en acide pyruvique. On forme l'osazone caractéristique en milieu acide par l'action de la 2-4 dinitrophénylhydrazine et la coloration est développée en milieu alcalin ; elle a un maximum d'absorption à 540 mμ.

Réactifs :

1. - Substrat : nous avons préparé le substrat F.D.P.Na à partir du F.D.P.Ca, selon la technique suivante : peser dans un tube à centrifuger 500 mg de F.D.P. monocalcique, ajouter 6 ml de HCl N/10 ; attendre 10 mn en agitant avec un petit pilon de verre, puis ajouter goutte à goutte une solution saturée de $C_2O_4Na_2$ jusqu'à ce qu'il ne se forme plus de précipité (attendre chaque fois le temps nécessaire à sa formation). Centrifuger, filtrer dans un ballon jaugé de 100 ml, rincer à l'eau le filtre et le tube, les eaux de lavage ne dépassant pas 50 ml. Ajuster le pH à 7,2 exactement avec de la soude normale. Compléter à 100 ml, mélanger et filtrer ; conserver à - 20°C.
2. - Tampon collidinique : 0,4 M de pH = 7,2. Dans un flacon taré peser 2,44 g de collidine (environ 2,56 ml). Remplir d'eau aux trois quarts. Transvaser en rinçant plusieurs fois dans un ballon jaugé de 50 ml et ajuster le pH à 7,2 à l'aide de quelques gouttes de HCl N ; amener le volume à 50 ml et conserver en chambre froide.
3. - Sulfate d'hydrazine : 0,056 M de pH = 7,2 (PM = 130,13), soit 0,728 g pour 100 ml. Ajuster le pH à 7,2 avec de la soude normale, filtrer et conserver en chambre froide.
4. - Acide trichloroacétique à 8 pour 100.
5. - Solution de 2-4 dinitrophénylhydrazine (2-4 DNPH) à 1 pour 1000 dans HCl 2N ; agiter et filtrer.
6. - Solution de soude : 0,75 N.
7. - Solution de soude 2N.
8. - Solution d'acide sulfurique 2N.

9. - Solution de molybdate acide d'ammonium : à 5 pour 100.
10. - Réactif de FISKE et SUBARROW : à 1' amino naphtol :

. Acide 1 amino 2 naphtol 4 sulfonique... 0,1 g
 . Métabisulfite de sodium..... 6,0 g
 . Sulfite anhydre de sodium..... 0,6 g
 . Eau distillée QSP..... 50 ml

11. - Solution étalon de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$: à 218 mg par litre (50 μg par ml).

Mode opératoire :

Nous avons utilisé la technique de SIBLEY et LEHNINGER (265) modifiée par SCHAPIRA, en 1953 (258).

Prélever dans un tube à centrifuger 0,50 ml du mélange à parties égales, extemporané, de la solution de tampon collidine et de la solution de sulfate d'hydrazine, 0,50 ml de solution enzymatique et 1,25 ml de FDPNa 0,01 M. Laisser incuber au thermostat à 25°C, 30 à 60 minutes. Stopper la réaction par 2,5 ml d'acide trichloracétique à 8 pour 100. Préparer un tube témoin avec les mêmes solutions, l'acide trichloracétique étant ajouté avant la solution enzymatique : ce tube porté au thermostat permet d'éliminer la scission spontanée du FDPNa.

Agiter, laisser reposer 10 mn, centrifuger.

Prélever 1 ml de liquide surnageant, ajouter 1 ml de soude 0,75 N, laisser reposer 10 mn, ajouter 1 ml de 2-4 DNPH, porter le mélange 10 mn exactement au thermostat à 38°C. Ajouter 7 ml de soude 0,75 N, laisser exactement 10 mn puis apprécier la coloration qui est stable 20 mn au photocolorimètre sur 540 m μ , en lumière verte.

Etalonnage :

Pour cela, laisser 1'enzyme à forte concentration, incuber 60 minutes avec le substrat (FDPNa) en présence d'hydrazine et de tampon collidine selon les normes du mode opératoire précité en utilisant plusieurs dilutions d'enzyme et les témoins dans les mêmes conditions. Stopper la réaction par 2,5 ml d'acide trichloracétique à 8 pour 100. Séparer le centrifugat en deux parties :

- Dans la première : prélever 1 ml et doser les trioses phosphates libérés par la 2-4 DNPH.

- Dans la deuxième : prélever 1 ml, ajouter 1,30 ml de soude 2N, laisser 20 mn à la température du laboratoire ; neutraliser en partie par 1 ml de H_2SO_4 2N, ajouter 5,2 ml d'eau distillée puis 1 ml de molybdate d'ammonium à 5 pour 100 et 0,50 ml de réactif de FISKE et SUBARROW ; laisser reposer 20 mn et apprécier la coloration au photocolorimètre à 650 m μ . Traiter les témoins de la même façon. Utiliser une solution étalon à 50 μg par Ml de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$.

Résultats :

La chute assez brutale d'activité aldolasique que l'on remarque dans les tableaux V et V', entre les stades G et H, peut être vraisemblablement imputable à la cryodessiccation. Cette chute est de 40 % entre G et H alors que la diminution continue progressivement jusqu'aux derniers stades à cause de l'autolyse qui entraîne une destruction aldolasique.

Tableau VACTIVITE FRUCTOSE DIPHOSPHATE ALDOLASIQUEPourcentage de substrat métabolisé

Echantillons	Dilutions	I n c u b a t i o n			
		30'		60'	
		M	σ	M	σ
A	1/2	14,5	1,61	26,6	3,70
	1/5	3,7	1,08	5,3	0,96
	1/10	0,8	0,47		
B	1/2	26,6	1,23	39,3	2,30
	1/5	6,6	0,71	8,3	0,79
	1/10	2,6	0,57	3,3	0,50
C	1/2	8,7	0,79	10,7	0,48
	1/5	5,6	0,48	6,5	1
	1/10	3,2	0,65	4,1	0,48
D	1/2	24,0	2,66	31,3	3,72
	1/5	13,8	3,50	16,1	2,50
	1/10	7,0	1,22	8,6	1,17
E	1/2	5,6	0,71	6,7	1,13
	1/5	1,5	0,55	1,8	0,85
F	1/2	9,6	0,66	18,6	1,26
	1/5	2,5	0,86	3,5	0,91
G	1/25	40,3	2,88	49,8	6,25
	1/50	14,5	0,95	17,8	1,34
	1/100	7,1	0,84	7,8	1,11
H	1/25	35,4	4,30	44,6	5,20
	1/50	8,6	0,65	13,6	4,25
	1/100	4	1,62	5,7	3,54

.....

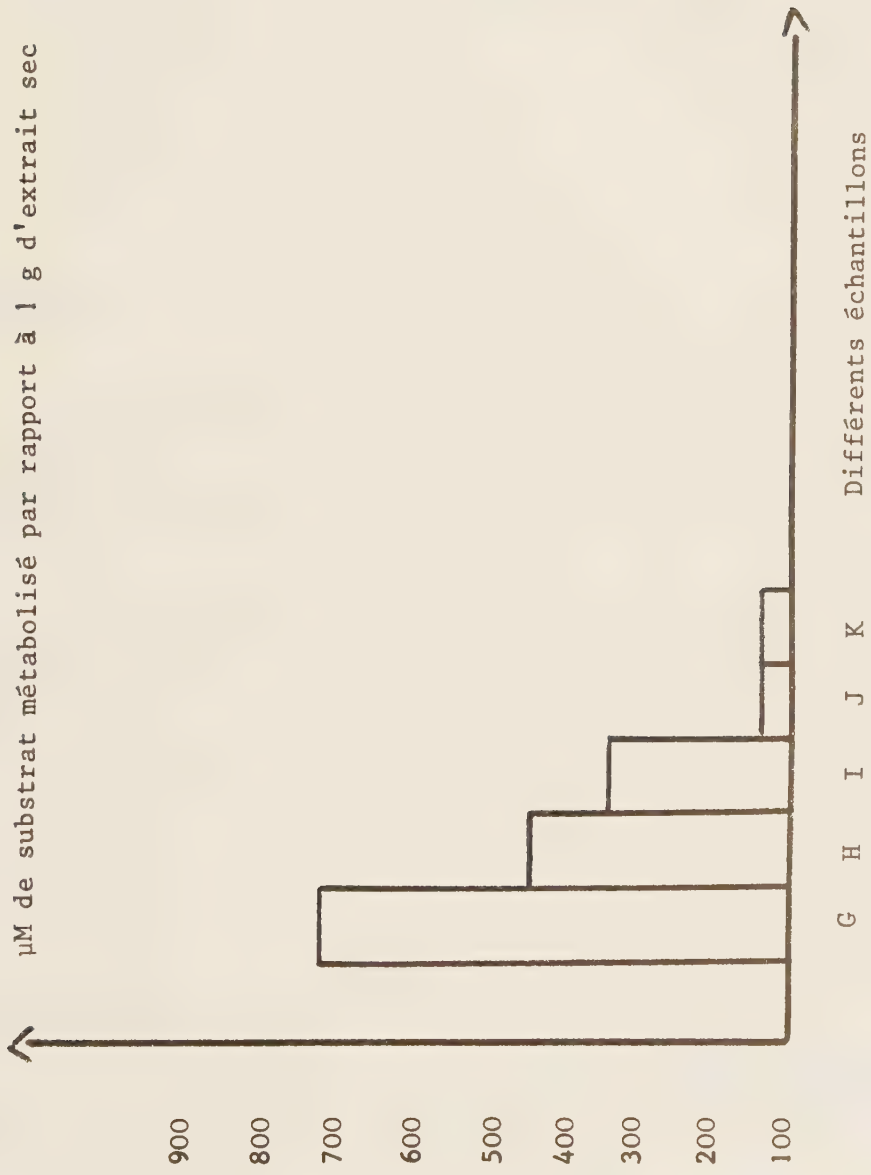
Tableau V (Suite) -

Echantillons	Dilutions	I n c u b a t i o n			
		30'		60'	
		M	σ	M	σ
I	1/100	12	1,32	15,5	2,12
	1/500	1	0,80	1,5	0,61
J	1/25	21,5	0,80	31,4	1,14
	1/50	9,3	2,56	16,6	3,30
	1/100	3,6	0,87	6,0	1,06
K	1/25	21,6	1,42	34,3	2,68
	1/50	9,7	0,82	15,0	0,93
	1/100	3,2	0,74	6,0	1,58

Tableau V'ACTIVITE FRUCTOSE 1-6 DIPHOSPHOALDOLASIQUE

Echantillons	Extrait sec en pour 100	μ M de substrat métabolisé /1 g d'extrait sec
G	25 - 26	733
H	22 - 23	454
I	88	340
J	66	140
K	66	140

SCHEMA N° 5 -



FRUCTOSE 1-6 DIPHOSPHOALDOLASE

C H A P I T R E VI

ACTIVITE GLUCOSE PHOSPHATE ISOMERASIQUE

GENERALITES -

La glucose phosphate isomérase ou phosphohexose isomérase (5.3.1.9.) est une oxydoréductase intramoléculaire agissant sur les aldoses et les cétooses (5.3.1.) et dont la découverte fut faite par LORMAN en 1933 (152) dans l'extrait musculaire. Cette enzyme de la glycolyse a fait l'objet de nombreux travaux qui soulignèrent sa très grande répartition dans les milieux biologiques (13, 14, 15).

NOLTMANN et BRUNS (209) obtinrent en 1959 à partir de la levure de bière une préparation concentrée de phosphoglucose isomérase. De même, HORECKER et Coll. (110) rendent compte de l'activité phosphohexose isomérasiqque de la levure.

Cette enzyme réalise la conversion réversible du glucose-6-phosphate en fructose-6-phosphate selon la réaction :



DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE -

L'activité glucose phosphate isomérasiqque a été appréciée, selon la technique de BODANSKI, de 1954 (28), quelque peu modifiée en 1962 par BASTIDE, BAUDON, MEUNIER et DASTUGUE (14).

Principe :

Le taux de conversion du G-6-P en F-6-P est mis en évidence par la coloration que donne à chaud le fructose avec le résorcinol, en présence d'ion ferrique en milieu acide (méthode de ROE) (249). Cette coloration est estimée par photocolorimétrie à 490 mμ.

Réactifs :

- Solution tampon de véronal-acétate, selon MICHAELIS de pH = 7,4 :

0,714 g de CH_3COONa , $3\text{H}_2\text{O}$ +
 14, 714 g de véronal sodique +
 Eau distillée QSP. 500 ml.

Conserver à + 4°C.

- Solution mère de substrat : de pH = 7,4 : Triturer pendant 5 minutes, dans un tube à centrifuger 0,391 g de G-6-P Ba, 7 H_2O avec 2 ml d'eau distillée et HCl 0,1 N pour dissoudre. Pour précipiter le Ba, ajouter goutte à goutte 4 ml de solution de SO_4Na_2 à 5 pour 100. Triturer, centrifuger et vérifier que le surnageant ne précipite plus par addition d'une goutte de solution de SO_4Na_2 . Prélever le surnageant et ajuster le pH à 7,4 à l'aide de NaOH 1 N ; compléter à 25 ml avec de l'eau distillée. Agiter, répartir en flacons de polythène et conserver à - 25°C.
- Solution tamponnée de substrat : mélanger 8,33 ml de solution mère de substrat, 25 ml de solution tampon et 24 ml de solution de HCl 0,1 N. Ajuster le pH à 7,4 et compléter à 200 ml avec de l'eau distillée. Agiter et répartir en flacons de polythène et conserver à - 25°.
- Solution aqueuse d'acide trichloracétique à 5 pour 100. Conserver à + 4°.
- Solution de résorcinol à 0,1 pour 100 dans l'éthanol absolu. Conserver à + 4°.
- Solution chlorhydrique de perchlorure de fer : dissoudre extemporanément 0,75 mg de perchlorure de fer dans 100 ml d'HCL ION.
- Solution aqueuse étalon de fructose à 90 mg par L.

Mode opératoire :

Préparer deux témoins non incubés :

- Témoin n° 1 : (réglage du photolorimètre) : 2 ml d'eau distillée.
- Témoin n° 2 : (quantité de fructose de la préparation enzymatique) : 0,5 ml de préparation enzymatique et 2 ml de solution tampon véronal-acétate.

Faire incuber pendant une demi-heure et une heure dans un bain-marie à 37° :

- Essai (activité enzymatique) : 0,5 ml de préparation enzymatique et 2 ml de substrat tamponné.
- Témoin n° 3 : (conversion spontanée du substrat) : 0,5 ml d'eau distillée et 2 ml de solution tamponnée de substrat.

En fin d'incubation, ajouter 2,5 ml d'acide trichloracétique pour stopper la réaction. Agiter, centrifuger et prélever 2 ml de surnageant ; ajouter dans tous les tubes : 2 ml de solution de résorcinol dans l'éthanol absolu et 6 ml de solution chlorhydrique de perchlorure de fer. Porter 8 minutes au bain-marie à $80^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Refroidir et apprécier la coloration par photolorimétrie à 490 mμ.

Etalonnage :

Il est effectué à l'aide d'une solution de fructose, dont les volumes de 0 - 0,2 - 0,4... 2 ml, additionnés de 2 - 1,8 ... 0 ml d'eau distillée et traités comme les 2 ml de surnageant, correspondent à 0 - 10 ... 90 pour cent de conversion de substrat.

Résultats :

Pour l'activité glucose phosphate isomérasique dont nous avons rassemblé les résultats dans les tableaux VI et VI', nous remarquons une légère diminution d'activité, de 10 pour 100, entre G et H et ensuite une bonne stabilité au cours de la conservation.

Tableau VI

ACTIVITE GLUCOSE PHOSPHATE ISOMERASIQUE

Pourcentage de substrat métabolisé

Echantillons	Dilutions	Incubation (minutes)			
		30'		60'	
		M	σ	M	σ
A	1/10	6,0	0,55	9,5	1,46
	1/25	3,6	1,01	5,3	1,47
	1/50	2,3	1,40	3,3	1,43
B	1/10	6,9	1,50	8,6	0,73
	1/25	4,5	1,41	5,1	1,09
	1/50	2,3	0,89	3,3	0,88
C	1/10	3,5	1,48	3,7	0,53
	1/25	2,0	1,03	2,5	0,82
D	1/10	2,3	0,94	4,0	1,17
	1/25	1,5	0,79	2,5	0,79
	1/50	0,5	1,27	1,7	0,80
E	1/10	7,1	1,03	11,6	0,68
	1/25	4,3	1,09	7,5	1,32
	1/50	3,8	1,34	6,0	1,17

.....

Tableau VI (Suite) -

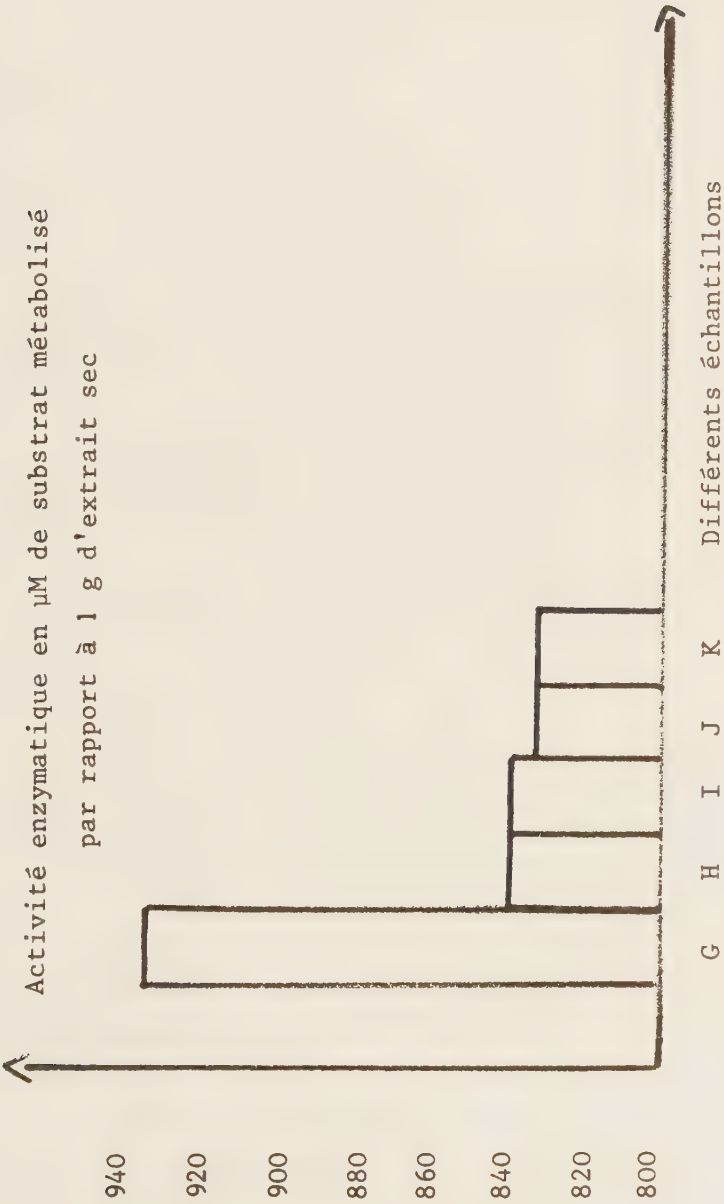
Echantillons	Dilutions	Incubation (minutes)			
		30 ^v		60 ^v	
		M	σ	M	σ
F	1/50	2,5	0,82	6,6	1,15
	1/100	2,1	0,74	6,5	1,46
	1/500	1,9	0,46	2,9	0,65
G	1/100	16,8	1,47	21,5	1,10
	1/500	6,0	1,46	8,5	1,20
	1/1000	4,5	1,32	7,1	1,96
H	1/50	14,5	1,52	15,6	1,29
	1/100	13,3	0,94	14,7	1,41
	1/500	12,8	1,72	13,0	1,25
	1/1000	3,7	0,78	6	1,37
I	1/1000	16,7	1,14	18,1	0,96
	1/2500	15,0	1,05	17,6	1,15
	1/5000	10,5	0,83	13,8	0,46
J	1/1000	9,7	1,56	14,2	3,64
	1/2500	8,0	1,14	9,5	0,70
	1/5000	2	1,06	2,8	1,23
K	1/500	16,0	1,25	19,0	1,48
	1/1000	10,0	2,14	13,9	3,36
	1/2500	7,0	2,08	8,9	1,68

Tableau VI^v

ACTIVITE GLUCOSE PHOSPHATE ISOMERASIQUE

Echantillons	Extrait sec en pour 100	μM de substrat métabolisé /1 g d'extrait sec
G	25 - 26	937
H	22 - 23	840
I	88	840
J	66	833
K	66	833

SCHEMA N° 6 -



PHOSPHOGLUCOSE ISOMERASE

C H A P I T R E V I I

DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL

Nous avons voulu suivre parallèlement à la dénaturation possible des enzymes, l'influence de la lyophilisation sur les protéines des différents échantillons de levures.

Nous n'avons pu employer la méthode de GORNALL, dosant les protéines biurétiques, car les divers constituants des levures produisaient un trouble important avec le réactif cuprotartrique et faussaient l'évaluation photolorimétrique.

Nous avons effectué pour chaque échantillon étudié un dosage de l'azote total par la technique de KJELDAHL.

Principe :

L'azote organique est minéralisé en détruisant le composé par l'acide surfurique concentré chaud, en présence d'un catalyseur de minéralisation. L'azote est transformé en ammoniac fixé par l'acide sulfurique puis déplacé par la soude concentrée (50 pour 100). On dose par acidimétrie en présence de l'indicateur DUPLEX.

Réactifs :

- Indicateur DUPLEX :

. DUPLEX concentré.....	5 ml
. Acide borique.....	20 g
. Eau distillée qsp.....	500 ml

Faire dissoudre l'acide borique dans 450 ml d'eau chaude. Après refroidissement, ajouter 5 ml de DUPLEX concentré et compléter à 500 ml.

- Acide sulfurique concentré
- Catalyseur de minéralisation : sulfate de potassium + oxyde de sélénium.
- Phénolphtaléine en solution alcoolique à 2 pour 100.
- Lessive de soude.
- Acide sulfurique N/10.

Mode opératoire :

a/ Minéralisation : Introduire dans un matras :

- . Substance à minéraliser 0,05 à 0,50 g
- . Catalyseur de minéralisation, soit SO_4K_2 + oxyde de sélénium 0,02 g
- . Acide sulfurique concentré 5 ml

Chauffer doucement au début, puis à ébullition que l'on maintient jusqu'à décoloration totale du liquide ; laisser refroidir.

b/ Entraînement à la vapeur d'eau et dosage : introduire la solution minéralisée dans le micro appareil de PARNASS. Rincer le matras avec deux fois 10 ml d'eau distillée ; ajouter les eaux de rinçage. Ajouter III gouttes de solution de phtaléine, puis 20 ml de soude à 50 pour 100 (jusqu'à virage du milieu). Effectuer l'entraînement à la vapeur et recueillir le produit d'entraînement dans 5 ml d'indicateur DUPLEX qui est rouge au départ et vire au vert franc en milieu ammoniacal. Titrer au fur et à mesure de la distillation par de l'acide sulfurique N/10 jusqu'à coloration gris lilas.

Expression des résultats :

1 ml d'acide sulfurique N/10 correspond à 0,0014 g d'azote :

- Soit n le nombre de ml de H_2SO_4 N/10,
- Soit p le poids de la substance.

La teneur en g d'azote total pour 100 g de substance est :

$$N = \frac{n \times 0,1401}{p}$$

Pour obtenir la quantité de protéines pour 100 g de substance, il faut multiplier ce chiffre N obtenu par 6,25.

Résultats :

Nous avons représenté dans le tableau VII nos résultats pour chaque échantillon, en grammes de protéines pour 100 g de substance, puis nous

avons rapporté ces résultats, comme pour les dosages enzymatiques, en gramme de protéines par gramme d'extrait sec de levure (ce chiffre nous étant communiqué par les Laboratoires BIOCDEX).

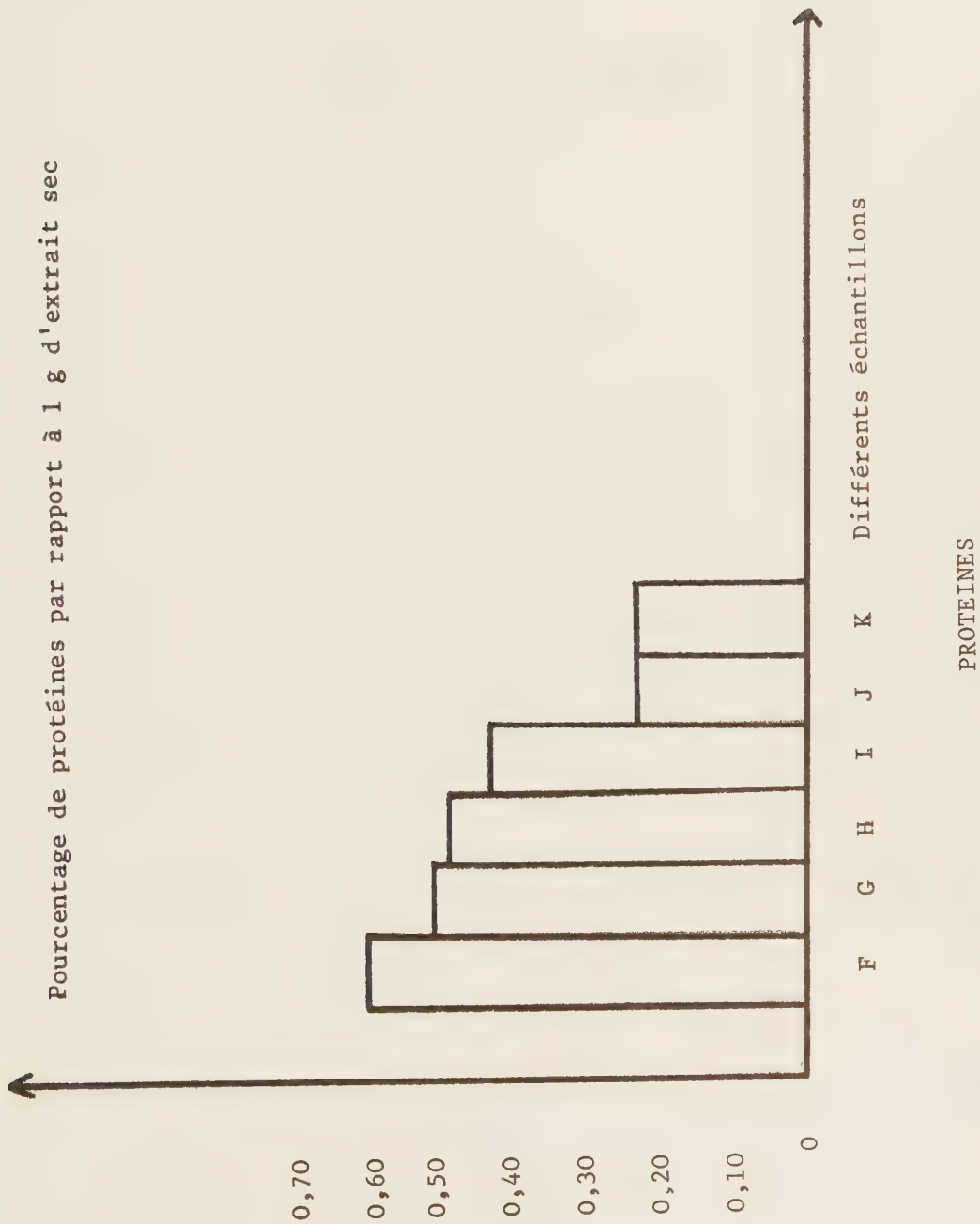
Nous constatons que la teneur en protéines ramenée à 1 g d'extrait sec de levure varie de façon très légère d'un stade à l'autre ; en effet, en ce qui concerne les stades G et H, c'est-à-dire avant et après lyophilisation, il n'y a, pour ainsi dire, fort peu d'altération notable des protéines. Nous rejoignons ici les observations de PAUFIQUE et Coll. de 1959 (224) qui rendent compte d'une faible différence de 6 à 7 pour 100 de l'azote total entre le vitré humain normal et le vitré lyophilisé, différence qui provient de l'humidité résiduelle.

Il faut signaler que nous constatons toutefois une légère diminution en protéines des stades I, J et K que l'on peut attribuer à la conservation des échantillons.

Tableau VII

ECHANTILLONS	PROTEINES en g pour 100	EXTRAIT SEC en pour 100	PROTEINES en g pour 1 g d'ES
A	1,50		
B	2,00		
C	1,65		
D	1,40		
E	1,30		
F	1,25	2	0,62
G	13,50	25	0,53
H	11,00	22	0,50
I	40,00	88	0,45
J	15,50	66	0,23
K	15,50	66	0,23

SCHEMA N° 7 -



C H A P I T R E V I I I

DOSAGE DES ACIDES DESOXYRIBONUCLEIQUE & RIBONUCLEIQUE

Le dosage des acides desoxyribonucléique (A.D.N.) et ribonucléique (A.R.N.) des levures comme celui des tissus animaux, doit être précédé de leur extraction. Pour cela, la méthode utilisée est celle de SCHNEIDER (260) modifiée par KULKA (140) et adaptée à nos échantillons.

Faire des dilutions de l'échantillon au 1/10 et au 1/20 selon la teneur en ADN et ARN avec de l'acide trichloracétique à 5 pour 100. Laisser ensuite une heure à 0°C, puis centrifuger à 2 000 tours/minute pendant 5 minutes ; décanner le surnageant, remettre le précipité en suspension (pour le laver) avec le même volume d'acide trichloracétique à 5 pour 100 que celui utilisé pour effectuer la dilution. Centrifuger, décanner le surnageant. Traiter le précipité par le même volume que précédemment d'acide trichloracétique à 5 pour 100. Porter le tout à 90°C pendant 15 minutes. Centrifuger à 4 000 tours/minute pendant 5 minutes.

On dosera l'ARN sur le surnageant ou sur les dilutions du surnageant ; nous utiliserons le surnageant au 1/10 et au 1/25 pour l'ADN et au 1/20 et 1/100 pour l'ARN.

DOSAGE DE l'A.D.N.

Par la réaction à la diphénylamine avec la méthode de DISCHE (61).

Principe :

La diphénylamine donne une coloration bleue avec les désoxypentoses.

Réactifs :

- Réactif de DISCHE à la diphénylamine : dissoudre 1 g de diphénylamine dans 100 ml d'acide acétique glacial très pur et ajouter 2,75 ml d'acide sulfurique concentré pur (se conserve peu, refaire tous les deux jours).
- Solution étalon à 0,10 g pour 100 ml dans l'eau distillée d'ADN polymérisé NBCo (à conserver à + 4°C).

Mode opératoire :

Mettre dans un tube à essai :

- Un volume de solution d'ADN à doser (2 ml),
- Deux volumes de réactif de DISCHE (4 ml).

Chauffer ce mélange à 100°C pendant au moins 10 minutes. Laisser refroidir et mesurer la coloration bleue obtenue au photolorimètre à 595 mμ.

Etalonnage :

Diluer au demi la solution d'ADN par un égal volume d'acide trichloracétique à 10 pour 100. Porter alors le mélange pendant 15 minutes au B.M. à 90°C. Répartir ensuite cette solution obtenue dans 6 tubes à essai à raison de 0, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6, 2 ml. Ajouter de l'eau distillée qsp 2 ml ; traiter alors comme la solution à doser. Cette gamme correspond à 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 mg d'ADN dans 1 ml de solution à doser.

DOSAGE DE L'A.R.N. -

Par la réaction à l'orcinol avec la méthode de MEJBAUM.

Principe :

Ce dosage est basé sur la réaction du pentose (ribose) avec l'orcinol en présence de Fe CL_3 (réaction de BIAL).

Réactifs :

- Réactif de MEJBAUM à l'orcinol modifié comme suit :

- . 1,7 ml de solution de Fe CL_3 (obtenue en mélangeant :
1 ml de sol. de Fe CL_3 Prolabo RP. à 28 pour 100 et
9 ml d'HCL concentré),
- . 0,100 g d'orcinol très pur,
- . HCL concentré qsp 100 ml.

On doit refaire ce réactif tous les jours.

- Solution étalon d'ARN : (NBCo Ribose nucleic acid reagent grade NBCo, PM = 1 303,8 ; N = 16,3 ; P = 9,5 ; N/P = 1,7) à 0,050 pour 100 (pour dissoudre mettre 5 ml de NaOH N/10).

Mode opératoire :

Mettre dans un tube à essai :

- Un volume de solution d'ARN à doser (2,5 ml),
- Un volume de réactif (2,5 ml).

Porter ce mélange au bain-marie bouillant pendant 20 minutes ; refroidir et apprécier la coloration verte au photolorimètre à 670 mμ.

Etalonnage :

Diluer au demi la solution étalon d'ARN par un égal volume d'acide trichloracétique à 10 pour 100. Porter alors 15 minutes au BM à 90°C. Répartir la solution obtenue dans 6 tubes à raison de : 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 ml. Ajouter de l'eau distillée qsp 2,5 ml et traiter comme l'ARN à doser. Cette gamme correspond à 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,20, 0,25 mg d'ARN dans 1 ml de solution à doser.

Calculs :

Dans un surnageant contenant de l'ADN et de l'ARN, il faut soustraire de la coloration verte totale donnée par l'orcinol la densité optique qui revient à l'ADN. Pour cela, effectuer la réaction à l'orcinol sur une gamme d'ADN. En se rapportant à cette courbe, chercher quelle densité optique donne à l'orcinol l'ADN trouvé pour cette dilution et la déduire de la densité totale trouvée pour cette dilution par la réaction à l'orcinol.

Résultats :

Nous avons exprimé nos résultats d'ADN et d'ARN, tout d'abord en γ par ml de sauce échantillon, mais étant donné les variations de concentration de chaque échantillon, cela ne nous permettait pas de donner une idée valable de l'influence de la lyophilisation, c'est pourquoi nous avons fait appel à la teneur en extrait sec et donné nos résultats en γ pour 1 g d'extrait sec.

Tableau VIII

ECHANTILLONS	A.D.N. γ par ml de S.M.	A.D.N. γ pour 1 g E.S.	A.R.N. γ par ml de S.M.	A.R.N. γ pour 1 g E.S.
A				
B	180		520	
C	360		820	
D	240		1 780	
E	400		2 200	
F	360	18 000	2 400	120 000
G	2 700	10 800	24 800	99 200
H	2 300	10 450	19 200	87 000
I	6 600	7 500	42 000	47 720
J	3 300	5 000	28 400	43 000
K	3 300	5 000	28 400	43 000

Nous voyons d'après le tableau VIII que la lyophilisation proprement dite (entre les stades G et H) n'endommage pas considérablement la teneur en A.R.N. et maintient pratiquement celle de l'A.D.N. de nos échantillons. On constate une légère diminution tout au long des différents stades qui semble être le résultat normal de la conservation.

Rappelons à ce propos qu'une comparaison fut établie par GRIGOR-YAN et Coll., en 1961 (100) entre les poids moléculaires des préparations lyophilisées et normales de D.N.A. : la lyophilisation montre une dépolymérisation des préparations de D.N.A.

Mais LYSTSOV et Coll. ne notent, en 1965 (166), après examen au microscope électronique, aucune cassure de la double hélice du D.N.A. après 25 cycles de congélation et de décongélation ; après 100 cycles, apparaissent des fragments sans changement de la structure secondaire.

C H A P I T R E IX

ESSAI D'INTERPRETATION ET DISCUSSION

Nous voudrions préciser que nous avons étudié les enzymes tant au point de vue expérimental que bibliographique, sous forme de préparations pharmaceutiques, c'est-à-dire, non pas à l'état pur mais considérées dans un certain milieu qui exerce une influence. Nous avons remarqué la différence de résistance de certaines diastases à la lyophilisation. Quelle que soit la réaction de l'enzyme à la cryodessiccation : destruction totale, inactivation passagère, conservation intégrale et peut-être même activation, **bien des** facteurs peuvent entrer en jeu mais trois nous ont paru vraisemblablement dominants :

- L'influence de la structure et de la nature chimique de l'enzyme,
- L'influence de la localisation de l'enzyme, intra ou extra-cellulaire et même sa répartition à l'intérieur de la cellule,
- L'influence de divers facteurs provenant du milieu environnant.

a/ Structure de l'enzyme

On a l'habitude d'attribuer aux enzymes de par leur nature protéique, une structure assez complexe, se décomposant en une structure primaire qui correspond à l'ensemble séquentiel des acides aminés liés par des liaisons de covalence (liaisons peptidiques), une structure secondaire obtenue par pliage et spirälisation de la chaîne peptidique, une structure tertiaire procédant à une mise en forme des parties organisées dans un état d'organisation supérieur par l'intermédiaire de liaisons hydrogène intra ou inter chaîne et des ponts disulfures ou esters phosphoriques et enfin une structure quaternaire pour organiser les sous unités en une protéine complexe.

La conformation active d'une protéine enzymatique est déterminée par l'ensemble d'un grand nombre d'interactions entre atomes ou groupes. Quand certaines interactions deviennent faibles, il y a désorganisation d'une partie de la structure. Il est probable que les conformations actives

de l'enzyme ne sont qu'à la limite de la stabilité et de ce fait la moindre modification par un quelconque procédé entraîne l'inactivation (BERNHARD) (22). La dénaturation peut être due au passage d'une structure ordonnée à une structure désordonnée, affectant principalement les structures secondaires, tertiaires et quaternaires. Un changement brutal et étendu de la forme polypeptidique endommage la structure secondaire : c'est ainsi que pour la trypsine, le déroulement des chaînes polypeptidiques, selon SUMMER et Coll. en 1950 (278) entraîne une dénaturation qui est réversible par réarrangement de la structure.

La diminution de l'activité enzymatique constatée pour quelques enzymes peut être le résultat de l'agglomération des protéines enzymatiques, par formation, selon HAMM et Coll., 1960 (106), de nouveaux ponts hydrogène électrostatiques entre les chaînes protéiniques. D'autres auteurs, comme GREIFF et Coll. (98) ont pensé que la diastase était protégée de la dénaturation par un mécanisme analogue à celui qui doit assurer la consolidation des ponts hydrogène nécessaires à la configuration de la protéine. CONNELL, en 1961, (44) suggère que l'augmentation de l'agglomération des protéines enzymatiques est due aux ponts disulfure présents dans la molécule. C'est surtout LEVITT, qui dès 1962 (145) observa que des ponts disulfure S-S étaient formés dans les molécules protéiniques pendant la congélation conduisant ainsi à une dénaturation de ces dernières. Il explique ce fait par l'hypothèse de la transformation des groupes SH libres en S-S ($2SH \rightarrow S-S$) et l'apparition des ponts S-S dans les protéines ; une similitude entre les effets de la congélation et ceux de la chaleur est remarquée, similitude qui se traduit par une augmentation des ponts S-S. Quand les protéines à groupements SH sont congelées, précisera l'auteur en 1965 (146) la formation de ponts S-S intra moléculaires est beaucoup plus accélérée que dans un gel non congelé. Tout ceci a conduit l'auteur en 1966 (147) à distinguer la possibilité d'une sensibilisation due aux groupes SH et la possibilité d'une protection due aux groupements S-S de la molécule protéinique contre la dénaturation, car lorsque les ponts S-S sont présents ils maintiennent la structure de la molécule inaltérée.

Nous sommes amenés maintenant à évoquer le problème de la révélation de l'enzyme. La diastase peut se trouver liée à la membrane sous forme de cénapse lipidoprotidique ; le cas le plus connu est celui de la xanthine-oxydase. Déjà en 1947, POLONOVSKI et Coll. (233) s'étaient aperçus de l'augmentation de l'activité, par refroidissement, de la xanthine-oxydase. Selon GREENBANK et Coll. en 1962 (96) le complexe lipoprotéique est inclus à la surface des globules gras ; ces complexes ou liposomes peuvent perdre leurs lipides et leurs acides nucléiques sous l'action de mécanismes de stress ; cette rupture s'accompagnera d'activation et de diffusion de l'enzyme dans la phase aqueuse.

D'autres auteurs sont allés plus loin ; il n'y a pas seulement "désorption" par rupture de cénapses, la configuration même de l'enzyme est différente à l'état adsorbé au sein des cénapses et en solution. Pour GREENBANK (96) il est possible qu'il y ait deux formes de l'enzyme : une forme stabilisée en forme inactive par association avec un globule gras, on l'appelle aussi forme "séquestrée" ou "l'état cryptique" et une forme active obtenue par révélation ou décénapsation (effet EULER) ; le passage d'une forme à l'autre au cours de la lyophilisation rendrait compte de l'augmentation de l'activité. Selon les conditions d'adsorption, la molécule protéique subit un déplissement ; le même mécanisme est en jeu au cours de la révélation qui s'accompagne d'une modification de la structure secondaire. La catalase de la levure est un exemple d'enzyme séquestrée : elle serait liée dans la cellule à une molécule d'ARN.

b/ Localisation de l'enzyme

Les enzymes peuvent occuper à l'intérieur de la cellule des positions différentes : les unes sont situées dans les organites intracellulaires tels que le noyau, les mitochondries, les microsomes surtout pour les diastases hydrolysantes ; les autres sont uniformément distribuées dans tout le cytoplasme (dipeptidases), d'autres enfin sont liées à la membrane de la cellule. Le comportement de l'enzyme à la lyophilisation varie en partie suivant sa localisation.

C'est ainsi que pour le lysosome, qui peut être grossièrement assimilé à un sac contenant des ferments à l'état latent. Aussi longtemps qu'il restera intact, aucune activité enzymatique ne pourra être observée mais une rupture de la membrane par différents procédés comme la cryodesiccation pourra activer certaines formes diastasiques. DIXON en 1964 (62) confirme la fuite des enzymes du lysosome sous forme soluble, en outre l'auteur précise que dans certains cas, il est possible de rompre la membrane sans détruire l'intégrité des particules cytoplasmiques, dans ce cas l'activité enzymatique reste la même. La libération d'enzymes lysosomiaux comme la phosphatase acide, la ribonucléase acide, les cathépsines peut se faire bien sûr, par variation de la perméabilité de la membrane (PARIENTE en 1966) (220) mais il est certain que les diverses enzymes ne sont pas liées de la même façon à l'intérieur du lysosome. En effet, si l'on soumet des lysosomes à une alternance de réfrigération et de réchauffement, la phase soluble selon GADJOS, 1966 (82) séparée par centrifugation de la fraction membraneuse renferme la totalité de l'arylsulfatase et de la β glucuronidase mais seulement 27 pour 100 de la ribonucléase et 45 pour cent de la phosphatase acide. L'enzyme peut donc se situer à la fois à la surface et dans le contenu lysosomal.

Etudiant l'activation des déshydrogénases mitochondriales, BENDALL et Coll. en 1960 (206) ont comparé cette activation à celle qui se passe au niveau du lysosome. La perméabilité de la membrane mitochondriale peut être augmentée afin que des molécules de substrat puissent pénétrer sans permettre une fuite des enzymes dans le milieu extérieur : de telles activations enzymatiques sont réversibles. Dans d'autres cas, la perméabilité peut augmenter suffisamment pour faciliter le passage de l'enzyme dans la solution dont elle augmentera l'activité mais cette activation est alors irréversible. En travaillant sur le taux d'hydrolyse enzymatique des peptides de cellules en suspension, ARPAI en 1961 (7) trouve une augmentation du taux de la réaction, après congélation par augmentation de la perméabilité des cellules aux peptides exogènes donc par augmentation de la quantité de substrat sous-entendant que la quantité d'enzymes est suffisante ; c'est une interprétation possible de l'augmentation de l'activité.

Nous pourrions considérer enfin le cas où l'enzyme est située sur la membrane même de la cellule. Des observations de STRAUB et Coll. de 1952 (275) il ressort que l'ATPase est fixée sur la membrane du globule rouge, la conservation intégrale de la structure de la membrane cellulaire est la condition du maintien de la teneur en ATPase. L'hémolyse par osmose n'ayant pour conséquence aucun dommage sur la structure de la membrane n'amène pas de diminution de la teneur en ATPase, par contre, l'hémolyse par congélation qui fait subir à la membrane cellulaire d'importantes modifications structurales, entraîne des variations d'activité. De la même manière, DATTA et Coll. en 1954 (57) remarquent la libération de la pyrophosphatase lors de la destruction des plaquettes ; quelques années plus

tard, LUSCHER en 1959 (160) parle de la fuite de la phosphatase acide comme fonction de la fragilité de la membrane plaquettaire.

c/ Influence de divers facteurs provenant du milieu dans lequel se trouve l'enzyme

Afin d'expliquer l'augmentation de l'activité enzymatique, STRAUB en 1952 (275) s'est attaché à l'hypothèse de la disparition du milieu environnant d'un inhibiteur diastasique avec le temps ou par suite des opérations de lyophilisation.

L'augmentation de la concentration en substrat pourrait rendre compte dans certains cas de la diminution de l'activité enzymatique. Selon LINEWEARVER, 1939 (149) et SIZER et Coll. 1942 (269), la vitesse de la réaction enzymatique est plus rapide dans un milieu surgelé que dans un milieu congelé car la vitesse diminue beaucoup quand l'état change : cette diminution est due à une augmentation de la concentration du substrat quand le milieu passe de l'état liquide à l'état solide.

Enfin en 1960, REY (242) expliqua les phénomènes de dénaturation de la façon suivante :

- A l'intérieur d'une même réaction, l'activité enzymatique décroissant plus rapidement que les processus de diffusion, la réaction ne peut plus atteindre un état d'équilibre.

- Dans une même chaîne de réactions, les différentes enzymes ne s'activent pas à la même température, il peut en résulter une accumulation importante de métabolites intermédiaires qui n'ont normalement qu'une existence transitoire et qui peuvent alors soit s'avérer toxiques, soit entraîner par la suite des perturbations métaboliques.

- Par suite du retrait brutal de l'eau, certaines molécules protéiques peuvent subir de légères altérations suffisantes cependant, pour qu'il n'y ait plus, lors de la reconstitution du tissu, adaptation parfaite entre l'enzyme et la partie réceptive de la molécule. La réaction diastasique risque alors d'être incomplète et même inhibée.

- Enfin, au cours de la décongélation, il peut se produire un déséquilibre enzymatique ; par suite de la dissociation de certaines molécules protéiques, en particulier des molécules lipoprotéiques, il peut apparaître des enzymes actives qui peuvent perturber le métabolisme normal.

Pour conclure, nous pourrions dire que s'il y a atteinte de la structure même de l'enzyme, entraînant une agglomération des protéines, il peut y avoir destruction totale de l'activité enzymatique. Nous n'avons pas rencontré, dans notre expérimentation personnelle, de destruction totale, car cette agglomération dépend des conditions de la lyophilisation ; avec de bonnes conditions opératoires, en particulier la présence de protecteurs comme le glycérol, les risques de dénaturation totale sont éliminés.

L'activation des enzymes par lyophilisation peut s'expliquer soit par la fuite de l'enzyme de son organite intracellulaire à travers une membrane dont la structure et la perméabilité sont modifiées, soit par rupture de cenapses, soit par révélation de l'enzyme jusqu'alors inactive.

Enfin la diminution de l'activité que l'on peut rencontrer est en relation avec les modifications de la perméabilité des membranes permettant un passage souvent sélectif d'enzymes, de substrat, d'inhibiteur enzymatique à l'intérieur de la cellule.

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES

Nous avons consacré nos recherches à l'examen de quelques activités enzymatiques, présentes dans les levures "Saccharomyces Cerevisiae" aux différentes étapes de la lyophilisation d'une préparation de levure.

Nous avons rappelé, dans la partie bibliographique, l'essentiel de nos connaissances concernant les levures, leur composition chimique et diastasique d'une part et d'autre part la lyophilisation, son influence sur les levures, les protéines et les systèmes enzymatiques.

Au point de vue expérimental, après des précisions sur le mode opératoire, nous avons examiné sept activités enzymatiques aux différents stades de la cryodessiccation : activités relatives aux amino transférase, à la phosphatase acide, à la β h fructofuranosidase, à la leucine amino-peptidase, à la fructose I-6 diphosphoaldolase et à la phosphoglucose isomérase. Nous avons résumé nos résultats dans le tableau ci-dessous :

ENZYME	Diminution de l'activité entre les stades G et H
Alanine amino transférase	28 pour 100
Aspartate amino transférase	30 pour 100
β h fructofuranosidase	0 pour 100
Fructose I-6 diphosphoaldolase	40 pour 100
Leucine amino peptidase	3 pour 100
Phosphatase acide	1 pour 100
Phosphoglucose isomérase	10 pour 100

- La β h fructofuranosidase semble être l'enzyme dont l'activité est la plus stable au cours de la lyophilisation des levures "Saccharomyces cerevisiae". En effet nous n'avons pas constaté de changement d'activité enzymatique entre les stades G et H (avant et après lyophilisation). Remarquons que dans les levures, cette enzyme est située au niveau de la membrane de la cellule.

- Deux autres hydrolases, la phosphatase acide et la leucine amino peptidase jouissent également d'une très grande stabilité à la lyophilisation puisque nous avons noté une diminution d'activité de 1 pour 100 pour la phosphatase acide et de 3 pour 100 pour la LAP.

- La phosphohexose isomérase et les transaminases GOT et GPT semblent être beaucoup plus fragiles avec une diminution d'activité de 10 et 30 pour 100 par lyophilisation.

- Enfin au cours de notre expérimentation personnelle, l'aldolase fut la plus fragile des enzymes étudiées avec une diminution d'activité de 40 pour 100.

Nous avons également étudié, par comparaison, les variations du taux des protéines, de l'A.D.N. et de l'A.R.N. qui semblent diminuer légèrement par lyophilisation.

Enfin, nous avons essayé de donner une interprétation plus générale de nos résultats en fonction de différents facteurs et en particulier de la structure de l'enzyme et de sa localisation.

De nombreuses recherches restent à entreprendre dans cet important domaine pour améliorer les conditions opératoires de la lyophilisation car ce sont vraisemblablement elles qui régissent la diminution, la stabilité ou peut-être même dans certains cas l'augmentation de l'activité enzymatique. Ces travaux seront susceptibles d'ouvrir plus largement cette nouvelle voie qui correspond à la thérapeutique enzymatique déjà si souvent mise à contribution en clinique humaine.

-:-:-:-

Vu le 12 décembre 1968

Clermont-Ferrand

Le Président du Jury

G. DASTUGUE

Vu et permis d'imprimer
n° Ph 11/68

Clermont-Ferrand, le
13 décembre 1968

Le Doyen de la Faculté Mixte
de Médecine et de Pharmacie

G. MEYNIEL

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - ALEXANDER K.M., LUSENA C.V. -
J. Dairy Sc., 1961, 44, 1414.
- 2 - AMADO L.A. -
Invest. Bol. Univ. Guadalajara 1963, 3, 18-25, 55-56.
- 3 - AMANO K., BITO M. -
Bull. Inst. Inter. du froid. Paris 1954, 35, 855.
- 4 - ANDJUS R.I. -
In traité de Lyophilisation. HERMANN ed., Paris, 1960, 403.
- 5 - ANDREEV K.P., AKURA U.D., SHARKUNOVA N.G. -
Khim. Pererabotka Drevesing Nauchn - Tekhn, 1964, 22, 8-11.
- 6 - ARIMOTO K., TAMURA A., KOBATAKE Y. -
Kokuritsu, Eigo Kenkysko kentigu Hokoku, 1962, 51-3.
- 7 - ARPAI J. -
Experientia, 1961, 17, 170-171.
- 8 - ASHMARIN I.P., ZEZEROV E.Q. -
Prikl. Biochim. Mikrobiol. 1967, 3 (1) 21-29.
- 9 - ATKIN L., MOSES W., GRAY P. -
J. Bact. 1949, 57, 575-578.
- 10 - BALLADE CH., OGIER R., FRAUX, BASTIDE P., DASTUGUE G. -
C.R. Soc. Biol., 1964, 158, 536-539.
- 11 - BALLS A.K., LINEWEAVER H. -
Food Research, 1938, 3, 56.
- 12 - BALLS A.K., TUCKER J.W. -
Ind. Eng. Chem., 1938, 30, 415.
- 13 - BASTIDE P. -
Thèse Doct. Etat Médecine. Clermont-Fd, de Bussac éd., 1961.
- 14 - BASTIDE P., BAUDON J., MEUNIER S., DASTUGUE G. -
Path. Biol., 1962, 10, 445-446.

- 15 - BASTIDE P., JACQUEMET L., SAINT-MARC J., DASTUGUE G. -
Rev. Med. Tours, 1962, 3, 551-554.
- 16 - BASTIDE P., JACQUEMET L., SIMON E., PLAT P.M., DASTUGUE G. -
Path. Biol., 1962, 10, 19-20, 1519-1523.
- 17 - BASTIDE P., SIMON E., SAINT-MARC J., DASTUGUE G. -
J. de Physiol., 1962, 54 (2), 287-289.
- 18 - BAUDON J., BASTIDE P., REBIERE J.P., DASTUGUE G. -
Path. Biol., 1961, 9, 1089.
- 19 - BAUM H., GILBERT G.A. -
Nature (London), 1953, 171, 983-84.
- 20 - BEHRENS M. -
Z. Physiol. Chem., 1932, 209, 59-74.
- 20b- BENDALL D.S., de DUVE C. -
Biochem. J. 1960, 74, 144.
- 21 - BERGER J.A. -
Bull. Soc. Pharm. Marseille 1957, 22, 139.
- 22 - BERNHARD S.A. -
Structure et fonctions des enzymes, 1969.
- 23 - BESSEY O.A., LOWRY O.H., BROCK M.J. -
J. Biol. Chem. 1946, 164, 321.
- 24 - BIGGER - GERHING -
J. Gen. Microbiol. 1955, 13, 45.
- 25 - BIJAK S., STERNIK E. -
Bull. Inst. Inter du Froid, Paris 1957, p. 1101.
- 26 - BILLINGHAM R.E. -
Biological Applications of freezing and Drying. Acad. Press
Inc., New-York, 1954, P. 253.
- 27 - BIRO NA.A., DEKANY G. -
Ann. Univ. Sci. Budapest, 1964, 7, 29-34.
- 28 - BODANSKY O. -
Cancer, 1954, 7, 1191-1199.
- 29 - BORDAS et d'ARSONVAL in BERGER -
La lyophilisation. Bull. Soc. Pharm., Marseille, 1957, 22, 139.
- 30 - BOYER P.D., LARDY H., MYRBÄCK K. -
In The Enzyme, Academic Press. New-York, 4 et 8, 1960-63.
- 31 - BRADY B.L. -
In Recent Research in freezing and drying, Blackwell Scientific
Publ. ed., Oxford, 1960.

- 32 - BRAUNSTEIN A.E., KRITZMANN M.G. -
Enzymologia, 1937, 2, p. 129.
- 33 - BRECHOT P., CROSSON M., C.R. -
C.R. Inst. Pasteur, Paris, 1958, 247, 539-542.
- 34 - BRUNNER J.R. -
J. of Dairy Sci., 1962, 45, 943.
- 35 - CAMMARATA P.S., COHEN P.P. -
J. Biol. Chem., 1951, 193, 53.
- 36 - CARRICK D.B. -
Connll. Univ. Agr. Expt. Sta. Mem. 1929.
- 37 - CHAMBERS M.A., NELSON J.W. -
J.A. Ph. A., 1950, 39, 323-6.
- 38 - CHICHESTER G.D. -
In Aspects théoriques et Industriels de la lyophilisation.
Hermann ed., Paris, 1964, 578.
- 39 - CHILSON O.P., COSTELLO L.A., KAPLAN N.O. -
Federation Proc. Suppl., 1965, 24 (2), 55-65.
- 40 - CODEX MEDICAMENTARIUS GALLICUS -
Commission Permanente de la Pharmacopée, Ordre National des
Pharmaciens ed., Paris, 1965.
- 41 - COLE L.J.N., KLUEPFEL D., LUSENA C.V. -
Can. J. Biochem. Physiol., 1959, 37, 821-27.
- 42 - COHEN P.P. -
Biochem J., 1939, 33, 1478.
- 43 - COHN E.J. -
Médecine, 1945, 24, 333-338.
- 44 - CONNELL J.J. -
Freeze drying Foods, Proc. Conf. Chicago, 1961, 50-58.
- 45 - CONNELL J.J. -
J. Food Sci., 1966, 31, 313-16.
- 46 - COOPERSTEIN S.J. -
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 73, 343-346.
- 47 - COUDERT J. -
In Traité de lyophilisation, Hermann ed., Paris, 1960, p.257.
- 48 - COURTOIS J.E., PERLES R. -
In Precis de Chimie Biologique, Masson ed. Paris, 1964-65,
1 et 2.
- 49 - COWIE W.P., LITTLE W.T. -
J. Food Technol. 1966, 1 (4), 335-343.

- 50 - CUVELIER R., BERGER J.A., TRONCHE P., CHAGNAUD J. -
Ann. Biol. Chem., 1954, 7 - 9, 1.
- 51 - DASTUGUE G., BASTIDE P., MARTIN G. -
Annales Pharmaceutiques Françaises, 1962, 20, 367-379.
- 52 - DASTUGUE G., BASTIDE P., PASQUIER P. -
Bull. Soc. Chim., Biol. 1959, 41, 743.
- 53 - DASTUGUE G., BAUDON J., BASTIDE P., CARCASSIN M. -
Ann. Biol. Chem. 1959, 17, 435.
- 54 - DASTUGUE G., JACQUEMET L., BASTIDE P., SIMON E., GREZE E. -
Transfusion, 1961, 4, 73.
- 55 - DASTUGUE G., JACQUEMET L., SAINT-MARC J., BASTIDE P. -
Trav. Soc. Pharm. Montpellier, 1962, 22 (n°1).
- 56 - DASTUGUE G., MATHON J. -
Thérapie, 1950, 5, 265.
- 57 - DATTA N., ZATICEK -
Acta Haematol, 1954, 12, 81.
- 58 - DEANE H.W., DEMPSEY E.W. -
Anat. record, 1945, 93, 401-417.
- 59 - DEISSEROTH A., DOUNCE A.L. -
Arch. Biochem. Biophys., 1967, 120, (3), 671-72.
- 60 - DENOËL A. -
Cours de Chimie Galénique, Presses Universitaires de Liège,
1964, 1, 117.
- 61 - DISCHE Z., in CHARGAFF S., DAVIDSON J.N. -
The Nucleic Acids., Acad., Press. New-York, 1955, vol. 1, 285-305.
- 62 - DIXON M., WEBB E.L. -
In Enzymes, Longmans ed., London, 1964, 13.
- 63 - DOPTER P. -
Ann. Inst. Pasteur (Lille), 1948, 1, 161-174.
- 64 - DOUNCE A., BEYER G.T. -
J. Biol. Chem. 1948, 173, 160.
- 65 - DOYLE W.L. -
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1948, 69, 43-44.
- 66 - DOYLE W.L. -
Fédération Proc. 1950, 9, 34.
- 67 - DRAUDT H.N., DAMON C.E., HUANG I.Y., CHANG M.T. -
Purdue University, Contract Research project Report, Projet n°7 -
48 - 06 031 A, 1961.

- 68 - DRAUDT H.N., YING HUANG I. -
J. Agr. Food. Chem., 1966, 14, 170-176.
- 69 - DUMAS J., BOULAY P. -
Ann. Chim. et Phys., 1828, 37, 45.
- 70 - ELANDER M. -
Arlaiv. Kemi., 1956, 9, 191.
- 71 - EMDIN R., RINDI S. -
Att. Soc. Ital. Sci. Vet, 1965, 19, 570-3.
- 72 - EMMEL in GERSH I., STEPHENSON J.L. -
Biological Applications of freezing and drying, Harris ed.
New-York Acad. Press, 1954.
- 73 - ENZYME NOMENCLATURE -
Recommandations 1964, of the International Union of Biochemes-
try, Elsevier publishing, Compagny, Amsterdam, London, New-york,
1965.
- 74 - Von EULER H. -
Fermentforschung, 1920, 4, 1942.
- 75 - Von EULER H., ASARNOJ P. -
Fermentforschung, 1920, 3, 318.
- 76 - FAYET M.T. -
Bull. Soc. Chim. Biol. 1959, 41 (9-10), p. 1196.
- 77 - FISCHER H.O.L., BAER E. -
Ber, 1932, 85, 337.
- 78 - FLOSDORF E.W. -
Freezing drying Reinhold Publishing corp. New-York, 1949.
- 79 - FLOSDORF E.W. -
Biological Applications freezing and drying, Harris ed. New-
York, Acad. Press., 1954, p.81.
- 80 - FRY R.M. -
Biological application of freezing and drying, Harris ed. New-
York, Acad. Press. 1951 p. 213-252.
- 81 - FRY R.M., GREAVES R.I.N. -
J. Hyg., 1949, 49, 220-246.
- 82 - GADJOS A. -
La Presse Médicale, 1966, 74, 923.
- 83 - GANE R. -
Biological Applications of freezing and drying Harris ed. Acad.
Press. New-York 1954, 185.
- 84 - GARANDA de la (otero) J.L., MARZO RODRIGO L.M. -
An. Real Soc. Espan. Fis. Quim. 1964, 60, 345-352.

- 85 - GERSH I., STEPHENSON J.L. -
Biological Applications of freezing and drying, Harris ed.
New-York, Acad. Press. 1954, p.329.
- 86 - GHETTE V., BUZILA L. -
Rev. Roumaine Biochim. 1964, 1, 41-49.
- 87 - GHOSH C. -
Stain Techniol., 1956, 31, 17-20.
- 88 - GIANETTO R., de DUVE C. -
Biochem. J., 1955, 59, 433.
- 89 - GLIOLITTI G. -
Att. Soc. Ital. Sci. vet. 1961, 15, 605-609.
- 90 - GOLDBARG J.A., RUTENBURG A.M. -
Cancer, 1958, 11, 283.
- 91 - GOLDBLITH S.A., KAREL M., LUSK G. -
In Aspects théoriques et industriels de la lyophilisation,
Hermann ed., Paris 1964, 525.
- 92 - GOULD E. -
Technol. Fish Util. Intern. Symp. Husum, 1964, 126-8.
- 93 - GREAVES R.I.N. -
In Biological applications of freezing and drying, Harris ed.
Académie Press. New-York, 1954, p. 87-88.
- 94 - GREAVES R.I.N. -
J. Pharm. Pharmacol., 1962, 14, 621-40.
- 95 - GREEN J.B., LELOIR L.F., NOCITOV -
J. Biol. Chem., 1948, 161-559.
- 96 - GREENBANK G.R., PALLANSCH M.J. -
J. of dairy Sci. 1962, 45, 958.
- 97 - GREIFF D. -
In Recent Research in Freezing and Drying, Blackwell Scientific
Publ. ed. Oxford 1960, p. 178.
- 98 - GREIFF D., MYERS M. -
Nature 1961, 190, p. 1 202.
- 99 - GREIFF D., RIGHTSEL W. -
In Lyophilisation, Recherches et Applications Nouvelles,
Hermann ed. Paris 1966.
- 100 - GRIGOR-YAN D.G., ZYKOY Y.V., MAKOVEEVA G.M., ANDRIANOVAS Y. -
Byull Exsperim. Biol. i Med. 1961, 52 (n°11) p. 51-54.
- 101 - GUIBERT L., BRECHOT P. -
Ann. Inst. Pasteur 1955, 88, 750-768.

- 102 - GULIDOVA G.P., SOROKINA I.M. -
Byull. Eksp. Biol. Med. 1967, 63 (1) 41-4.
- 103 - GYEVAI A., KAPA E. -
Acta Morpho. Acad. Sci. Hung. 1961, 10, 49-58.
- 104 - HACKENBERG U. -
In Progrès Récents en lyophilisation, Hermann, Paris, 1962,
p. 100.
- 105 - HALWER M. -
J. Amer. chem. Soc. 1954, 76, 183-186.
- 106 - HAMM R., DEATHERAGE F.F. -
Food Research 1960, 25, 573.
- 107 - HARDEN A., YOUNG W.J. -
Proc. Roy. Soc. 1908, 80, 229.
- 108 - HEPBURN J.S. -
Biochim. Bull. 1915, 4, 13b - 150.
- 109 - HETHERINGTON D.C. -
In Biological Application of freezing and drying, Harris ed,
New-York, Acad. press. 1954, p. 194.
- 110 - HORECKER L., MEHLER A.H. -
Am. Rev. Biochim. 1955, 24, 207.
- 111 - HOSMAN L. -
Pocialist. zemèdèlstvi, Za, 9, 519-523.
- 112 - HYATT G.W. -
In Traité de lyophilisation, Hermann ed. Paris 1960, p. 298.
- 113 - ILIFF C.E., WOOD R.N., HOLLANDER M.D. -
Am. J. Ophth. 1956, 41, p. 505.
- 114 - JAVILLIER M., POLONOVSKI M., FLORKIN M., BOULANGER P., LEMOIGNE M.,
ROCHE J., WURMSER B. -
In Traité de Biochimie générale, Masson ed. Paris II, 1964.
- 115 - JEFFREE G.M. -
Bioch. Biophys. Acta. 1956, 20, 513.
- 116 - JONES N.R., MURRAY J. -
Biochim. J. 1961, 80, 26-27.
- 117 - JOSLYN M.A. -
Advances in enzymology, 1949, 9, 613-651.
- 118 - JOSLYN M.A. -
Proc. 8th Intern. Congr. refrig. 1951, 331-334.
- 119 - JOSLYN M.A., SHERRILL M. -
Ind. Eng. Chem., 1933, 25, 416.

- 120 - KEIR H.M., SHEPHERD J.B. -
Biochim. JJ. 1965, 96, 483-489.
- 121 - KELTZ A., LOVELOCH J.E. -
Biochim. Biophys. Acat 1957 (in press).
- 122 - KERTESZ Z.I. -
Z. physiol. Chem., 1933, 216, p. 229.
- 123 - KERTESZ Z.I. -
J. Amer. Chem. Soc., 1942, 644, p. 2577.
- 124 - KHAN A.W. -
Criobiology 1966, 3, p. 224-9.
- 125 -KHENOKH M.A., ALEKSANDROVA V.N. -
Sb. Rab. Inst. Isitol. Arad. Nouk 555R, 1966, 12, 27-32.
- 126 -KHENOKH M.A., PERSHINA V.P., LAPINSKAYA E.M. -
Tsitologiya 1966, 8 (16), 769-72.
- 127 - KHUN R. -
Naturwiss. 1923, 11, 732.
- 128 - KHUN R. -
Z. Physiol. Chem. 1923, 125-28.
- 129 - KIERMEIER F. -
Biochem. 3, 1947, 275, p. 318 - 318 p. 275.
- 130 - KIERMEIER F., KÖBERLEIN W. -
Biochem. Z., 1957, 329, p. 247.
- 131 - KING E.J., GARNER in KING E.J. -
Microanal. in Medic. Biochim. Churchill ed. London, 1947.
- 132 - KITAMURA K. -
Res Phys. Chem. Jap., 1965, 35, 44-9.
- 133 - KLINKHAMER J.M., EICHEL B. -
Nature, 1962, 193, 944-6.
- 135 - KOPPEL J.L., OLDWIN J.H. -
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1954, 86, 641.
- 136 - KRONMAN M.J., WINTER BOTTO M. -
J. Agr. Food Chem. 1960, B, 67 - 72.
- 137 - KUHLMAN R.E. -
J. Leil Comp. Physiol. 1959, 53, 313-326.

- 140 - KULKA R.G., DUSKIN D. -
Biochem. Biophys. Acta 1964, 91 (n°3) 506-514.
- 141 - KUPRIANOFF J. - Rev. Conserve 1961, 16 (5) 35-45.
- 142 - KUSHNAREV V.M., BLAGOVESHCHENSKII V.A. -
Biokhimiya, 1961, 26, 688-93.
- 143 - LEVITT J. -
In Protophasmatologia Springer Verlag. Ed. Vienne, 1958, 8.
- 144 - LEVITT J. -
Ann. New-York Acad. Sci. 1960, 85, p. 570-575.
- 145 - LEVITT J. -
J. Theoret. Biol. 1962, 3, 355-391.
- 146 - LEVITT J. -
Cryobiology, 1965, 1, 312-316.
- 147 - LEVITT J. -
Cryobiology, 1966, 3 (3), 243-249.
- 148 - LIDFORSS B. -
Flora Lunds Univ. Arsska (N.F.) 1907, 2, 1-76.
- 149 - LINEWEAVER H. -
J. Am. Chem. Soc. 1939, 61, 403.
- 150 - LINNANE A.W., STILL J.L. -
Arch. Biochem. and Biophys. 1955, 59, 383.
- 151 - LODDER J., SLOOFF W.C.H., KREGER Van RIJ N.J.W. -
In The Chemistry and Biology of yeasts Cocke A.H., Acad. Press
7, 1958.
- 152 - LOHMAN K. -
Biochem. Z, 1933, 262, 137-51.
- 153 - LOSSOUARN E.P. -
Produits pharmaceutiques 1954, 9, 79-85.
- 154 - LOVE R.M.
Nature, 1956, 178, p. 988-89.
- 155 - LOVE R.M. -
J. Sci. Food Agr. 1958, 9, 609-17.
- 156 - LOVE R.M. -
J. Sci. Food Agr. 1962, 13, 269-278.
- 157 - LOVE R.M. -
J. Sci. Food. Agr 1966, 17 (9) p. 465-71.
- 158 - LOVE R.M. -
Nature, 1966, 211 (5052) p. 981-2.

- 159 - LOVELOCK J.E. -
Proc. Roy. Soc. London B, 1937, 147 p. 417.
- 160 - LUSCHER E.F. -
Schweiz. med. Wochr., 1959, 89, 1021.
- 161 - LUSENA C.V. -
Can. J. Biochem., 1965, 43, 1787-98.
- 162 - LUSENA C.V., DASSE M.S. -
Can J. Biochem., 1966, 44, 775-81.
- 163 - LUYET B.J. -
In Report of Symposium Freezing and Drying, 1951, 87.
- 164 - LUYET B.J. -
In Recents progrès en lyophilisation, Hermann ed. Paris 1962
p. 5.
- 165 - LUYET B.J., GEHENIO P.M. -
Biodynamica Normandy, Miss., 1940, 1-341.
- 166 - LYSTOV V.N., KOPANKINA E.A., MALYSHEVA L.F., MOSHKOVSKII Y. -
Sh. Biofizika, 1966, 11, 726-28.
- 167 - MAC CORMICK P.Y. -
Ind. Eng. Chem., 1966, 58 (2), 58-62.
- 168 - MAC KENZIE A.P., LUYET B.J. -
Nature, 1967, 215, 83-4.
- 169 - MANGEOT J.P.F. -
1964.
- 170 - MARTIN G. -
Thèse Doct. Pharmacie, Grande Imprimerie Nouvelle ed.
Montluçon, 1961.
- 171 - MARTIN G.B., TARR H.L.A. -
Can. J. Biochem. Physiol., 1961, 39, 297-308.
- 172 - MARUTYAN S.A., MANTASHYAN E.A. -
Vinodelie Vinogradaistro 355 R, 1961, 21 (2), 31-33.
- 173 - MASTENBROEK G.G.A. -
In Biological applications of freezing and drying. Harris ed.
New-York Acad. Press. 1954, 181.
- 174 - MATHESON N.A. -
J. Sci. Food Agr., 1962, 13, 248-54.
- 175 - MAZUR P. -
Ann. of the New-York Acad of Sci., 1960, 85, 611-629.
- 176 - MAZUR P. -
Biophys. J., 1963, 3, 323 - 353.

- 177 - MEAN WHILE, SCOTT in GREAVES R.I.N. -
J. Pharm. Pharmacol., 1962, 14, 621-640.
- 178 - MEISTER A. -
In Methods in Enzymology, Academic Press. London and New-York
1955, 2, 380.
- 179 - MEJBAUM W. in CHARCAFF E., DAVIDSON J.N. -
The Nucleic Acids, Academic Press, New-York, 1955, Vol. 1,
301.
- 180 - MERGENTIME M., WIEGANDE H. -
Fruits Produits J., 1946, 26, 72.
- 181 - MERYMAN H.T. -
Sciences 1956, 124, 515-521.
- 182 - MERYMAN H.T. -
Ann. New-York Acad. Sci. 1960, 85, 503-509.
- 183 - MEYERHOF O. -
Bioch. Ztsch. 1934, 98, 271-74.
- 184 - MEYERHOF O., LOHMANN K. -
Biochem. Zn 1934, 271, 89.
- 185 - MIGITA M., MASTSUMOTO J., SAISHU T. -
Nippon Suisan Gakkaishi, 1956, 22, 433-9.
- 186 - MIRSKY A.E. -
Cold Sping Harbor Symposia, 1951, 16, 481-482.
- 187 - MIRSKY A.E. -
Meeting Cambridge, Bulterworths, Londres, 1959, 60, 167-169.
- 188 - MIYAGAWA K., SANNOE K., SUZUKI R. -
Arch. Biochem. Biophys., 1965, 110, 432-7.
- 189 - MOORE S. -
Bull. Soc. Chim. Biol. 1964, 46 (12) p. 1739.
- 190 - MOORJANI M.N., IYENGAR J.R., BHATIA D.S. -
Food Sci. India, 1958, 7, (2), 31-2.
- 191 - MOREAU R. -
Probl. et tech., 1967, n° 159, 61.
- 192 - MORICHI T., IRIE R., YANO N., KEMBO H. -
J. Gen. Appl. Microbiol., 1963, 9, 149-61.
- 193 - MORICHI T., IRIE R., YANO N., KEMBO H. -
Agr. Biol. Chem., 1965, 29, 61-5.
- 194 - MORONE G. -
G. Ital. Oftal, 1957, 10 (2), 102-111.

- 195 - MUGGLETON P.W. -
In Recent Research in freezing and drying, Blackwell ed. Oxford
1960, p. 229-237.
- 196 - MYERS R.P., SIMPSON E.G. -
U.S. 2, 762, 749, sept. 11, 1956.
- 197 - NAGANA B.C., NARAYANA, MENON J.K. -
J. Biol. Chem., 1948, 174, 501.
- 198 - NAIDO O., PRATT O.E. -
Acta Histochem., 1956, 3, 85-103.
- 199 - NASH T. -
Nature G.B. 1961, 192, p. 360-1.
- 200 - NASH T. -
J. Hyg. 1962, 60, p. 353-8.
- 201 - NEGISHI M., URITANI I. -
Nippon Phokuhin Kagyo bakkaishi, 1964, 11, 371-6.
- 202 - NEI T., OGAWA T. -
J. Agr. Chem. Soc. Jap. 1954, 28, p. 91-94.
- 203 - NEUBERG C., MANDL I. -
In J.B. Summer et K. Myrbäck The Enzymes Acad. Press, New-York
1951, 1, 527.
- 204 - NEMITZ G. -
Kaelltetechnik, 1964, 16 (11) 368-72.
- 205 - NEUMANN K. -
Ger. 1,004, 342, Mar. 14, 1957.
- 206 - NEUMANN K. -
In TRaité de lyophilisation, Hermann ed. Paris, 1960, p. 177.
- 207 - NIKKILA O.E. -
Nord KJ lemøte 1957, 7 pp.
- 208 - NODA L. -
J. Biol. Chem., 1958, 232, 237-256.
- 209 - NOLTMANN E., BRUNS F.H. -
Biochem. Z. Dtsch. 1959, 331, p. 436-45.
- 210 - NORD F.F., LANGE F.E.M. -
Nature, 1935, 135, 1001.
- 211 - OBAYASHI Y. -
In Récent Research in Freezing and drying, Blackwell Scientific
Publ. Ed., Oxfort, 1960, 221-228.
- 212 - OBAYARHI A., IWANO S., KUSAKA I., KITAHURA K. -
Nippon Nogeikagaku Kaishi, 34, 16-22.

- 213 - OGIER R., BASTIDE P., FRAUX, DASTUGUE G. -
Association de Physiologistes, Louvain 1965.
- 214 - OGIER R., BASTIDE P., DASTUGUE G. -
Path. Biol. 1966, 14 (1-2), 85-107.
- 215 - OSHIRO Z. -
Kagoshima Daigaku Suisan Gakubu kigo, 1965, 14, 111-15.
- 216 - DYAAS J., MARVIN J.J. -
Journ. Bact., 1946, 51 (3), 393-95.
- 217 - PAFOMOV C.A., ZYKOVA K.I., ARTAMONOVA S.A. and GARINA M.M. -
Probl. Dermatol. Percliv. Krovi 1967, 12 (4), 32-36.
- 218 - PARKES A.S. -
In Recent Research in Freezing and drying, Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1960, 304-311.
- 219 - PARKES A.S. -
In Recents Progrès en lyophilisation, Hermann ed. Paris, 1962, 1 - 5.
- 220 - PARRIENTE R. -
Semaine des Hôpitaux, 1966, Avril, 1072.
- 221 - PARRINI L. -
Spérimentale, 1960, 110, p. 63-7.
- 222 - PARTMAN W. -
Wissensch. Veröff. Dtsch. Ges. f. Ernährung Helftn, 1964, 8, 12-30.
- 223 - PASQUIER P. -
Thèse Doct. Pharm. Clermont-Fd, 1958.
- 224 - PAUFIQUE L., FAYET M.T., RAVAUULT M. -
Annales d'occulistique 1959, 192, 241-54.
- 225 - PAYEN R. -
Can J. Rescarch B. 27, 1949, 749.
- 226 - PEREZ J.J. -
In Techniques de Laboratoire Masson et Cie ed., Paris, 1954, 490.
- 227 - PEUZIAT C. -
Thèse vétérinaire 1966, n° 56.
- 228 - PISKAREV A., LUK'JANICA L. -
In Bull. Inst. Inter du froid, Paris 1957, 1307.
- 229 - PLAT P.M. -
Thèse Doct. Médecine, Clermont-Ferrand, 1962.
- 230 - PODOL'SKII M.V., KARLOVA N.G., ROZENBERG G.Y. -
Probl. Gematol. Pereliv. Krovi., 1967, 12, 27-32.

- 231 - POLDGE G., SOLTYS M.A. -
In Recent Research in Freezing and Drying, Blackwell Scientific
Publ. Oxford, 1960, 87-100.
- 232 - POLLOC G.E., HOLMSTROM C.D. -
Cereal. Chem., 1951, 28, 498.
- 233 - POLONOVSKII M., NEUZIL E., BAUDU L., POLONOVSKII J.C.R. -
Soc. Biol., 1947, 141, 460.
- 234 - PONOMAREVA L.V., DROBIZ F.D.-
Sbornik. Nauch. Rabot. Sverdlouska, Nauch. Issledovatel.
Kozhno-Venerol. Inst. i Kafedry. Kozhi i Vener. Boleznee,
1958, 3, 255-9.
- 236 - PROSKURYAKOV N.I., OPARYSHEVA E.F. -
Mikrobiologiya, 1956, 25, 600-5.
- 237 - PYKE M. -
In The Chemistry and biology of yeasts, A.M. look Acad Press,
1958, 557.
- 238 - QUIOCHO F.A., RICHARDS F.M. -
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1964, 52, 833-839.
- 239 - REITMAN S.M.D., FRANKEL S.P.H.D. -
Amer Clin. J. of Clin. Patho., 1957, 28, 56.
- 240 - REY L. -
In Bull. Inst. Inter du froid, Paris, 1957, 37, 1115-49.
- 241 - REY L. -
Proc. Roy. Soc. London B, 1957, 147, 460.
- 242 - REY L. -
In Traité de lyophilisation, Hermann ed. Paris, 1960, 21.
- 243 - REY L. -
In Recents Progrès in lyophilisation, Hermann. Ed. Paris, 1962,
127.
- 244 - REY L. - In Aspects théoriques et Industriels de la lyophilisation,
Hermann éd. Paris, 1964, 621.
- 245 - RHODES D.N. -
J. Sci. Food. Agr., 1961, 12, 211-24.
- 246 - RICHARDSON G.H., CALBERT H.E. -
J. of Dairy Sci., 1959, 55, 907.
- 247 - ROBERT L., POLONOVSKII J. -
In Traité de Biochimie Générale, Masson éd., 1964, 2, 6-7.
- 248 - ROCHE J. -
In The Enzymes, J.B. Summer et K. Myrbâch., Acad.Press New-
York, 1951, 1, 48.

- 249 - ROE L. -
J. Biol. Chem., 1934, 107, 15.
- 250 - ROINE P. -
Ph. D. Thesis Helsinki, 1947.
- 251 - ROSTAND J. -
C.R. Acad. Sci., 1946, 234, 2310-2312.
- 252 - ROY E. -
J. Canad. J. Biochem., 1966, 44, 1093-98.
- 253 - RUTENBURG A.M., GOLDBARG J.A., PINEDA R.P. -
The New England J. Med, 259, 469.
- 254 - RZEDOWSKA H. -
Prace Inst. i lab. Badawczych Przemyster Spozywehego, 1959,
9, 1-21.
- 255 - SAATCHAN A. -
Biokhimiya, 1946, 11, 89.
- 256 - SAITO Z., HASHIMOTO Y. -
J. Fac. Agr. Hokkaido Univ., 1962, 52, 162-85.
- 257 - SCHAFFNER A., KRUMEY F. -
Z. Physiol. Chem., 1938, 255, 145.
- 258 - SCHAPIRA G., DREYFUS J.C., SCHAPIRA F. -
Semaine des hôpitaux, 1953, 29, 1917.
- 259 - SCHARFF D., VESTERGAARD, BOGIND B. -
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1966, 18, 87-95.
- 260 - SCHNEIDER W.C. -
J. Biol. Chem., 1945, 161, 293.
- 261 - SCHWARTZ M.K., DANIEL D., YING S.H., BODANSKY D. -
Am. J. Clin. Pathol., 1956, 26, 513-16.
- 262 - SHEGAL P.P., NAYLOR A.W. -
Plant Physiol., 1966, 41, 567-72.
- 263 - SHERMAN J.K. -
Freezing and Freeze-drying of bull spermatozoa. Amer. J. Phys.
1957, 190, 281-286.
- 264 - SHIKAMA K. -
Sci. Rep. Tohoku Univ. Fourth Ser. 1963, 29, 91-106.
- 265 - SIBLEY J.A., LEHHINGER A. -
J. Nat. lancer Inst., 1949, 3, 303.
- 266 - SIZER I.W. -
J. Cellular Comp. Physiol., 1937, 10, 61.

- 267 - SIZER I.W. -
J. Gen. Physiol., 1938, 21, 695.
- 268 - SIZER I.W. -
Advances in Enzymology, 1943, 3, 41.
- 269 - SIZER I.W., JOSEPHSON E.S. -
Food Research, 1942, 7, 201-209.
- 270 - SKINNER CE. -
Molds yeasts and Actinomycètes, Wilec, New-York chapitre IX.
- 271 - SMART H.F. -
Sciences, 1935, 82, 525.
- 272 - SMITH A.U. -
In Biological Applications of Freezing and Drying, Harris ed.
New-York Acad. Press, 1954, 17.
- 273 - SOMMERS E.B. -
Dissertation Abstracts, 1960, 20, 2845.
- 274 - STERN H., MIRSKY A.E. -
J. Gen. Physiol., 1953, 37, 177-187.
- 275 - STRAUB C. -
Acta Physiol. Acad. Sci. Hung, 1952, 3, 513.
- 276 - STRAUB C.-
Acta Physiol. Acad. Sci. Hung, 1953, 4, 31.
- 277 - SUMMERS D. -
In Bull. Inst. Inter du froid, Paris, 1957, 841.
- 278 - SUMMER J.B., MYRBACK K. -
In The Enzyme, Acad. Press New-York, 1950, 1, 17.
- 279 - SIZUKI T., KANNA K., TANAKA T. -
Nippon Suisan Gakkaishi, 1964, 30, 1022-37.
- 280 - SWARZ M.N., KAPLAN N.O., FRECH M.E. -
In Influence of temperature on biological système, F.H.
Johnson éd. 61, 70. Society of general Physiology, Washington
D.C. 1957.
- 281 - SZWARC B. -
Klin Oczna, 1961, 31, 289-293.
- 282 - TAGLIABUE L. -
Chimica, 1958, 34, 488-91.
- 283 - TAKAHASHI T., KANNA K., TAKEI M., TANAKA T. -
Nippon Suisan Gakkaishi, 1964, 30, 1037-40.
- 284 - TAKAKUWA M. -
Mem. Ehime Univ. Sect VI, 1958, 3, 179-183.

- 285 - TANIKAWA E., AKIBA M., KAWAKAMI K. -
In Bull. Inst. Inter. du froid, Paris, 1955, 35, 855.
- 286 - TAVLITSKI J. -
C.R. Acad. Sci. 1958, 247, 1246.
- 287 - TAYLOR A.C. -
Proc Roy Soc. London B, 1957, 147, 466.
- 288 - TAYLOR A.C. -
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1960, 85, 595-609.
- 289 - THOMPSON M.P., BRUNNER J.R., STINE C.M., LINDQUIST K. -
J. Dairy Sci. 1961, 44, 1589.
- 290 - TORÖK G. -
In IX Congrès International du froid, 1955, 873.
- 291 - TOURNAIRE D., BASTIDE P., DASTUGUE G. -
C.R. Soc. Biol., 1966, 160, 1597.
- 292 - UEOKA Y., OKA H., SUEMITSU H. -
Nippon Sholuhin Kogyo Gakkaishi, 1964, 11, 12-20.
- 293 - UEOKA Y., OKA H., SUEMITSU -
Nippon Shokuhin kogyo Gakkaishi, 1966, 13, 18-24.
- 294 - ULLRICH H., HEBER U. -
Planta, 1961, 57, 370 - 390.
- 295 - UTEVS'KA L.A., TROYANOV'S'KA M.L. -
Ukr. Biobehim 2 h., 1966, 38, 362-366.
- 296 - VOIGTLÄNDER H., UNTERKÜHLING, KÄLTETOD der PFLANZEN -
Beirtr. Biol. PFLANZ, 1909, 9, 359-414.
- 297 - WALLENFELS K., MALHOTRA O.M. -
In The Enzyme, Acad. Press New-York, 1960, 4, 412.
- 298 - WANG, GROSMAH -
In Biological Applications of Freezing and Drying, Harris,
NY Acad Press, 1954, 329.
- 299 - WARAVDEKAR V.S., GOLDBLATT P.J., TRUMP B.F., GRIFFIN C.C.,
STOWELL R.E. -
J. Histochem. Cytochem, 1964, 12, 498-503.
- 300 - WARBURG O., CHRISTIAN W. -
Biochem. 2, 1943, 314, 149.
- 301 - WARNER R.C., LEVY M. -
J. Amer. Chem. Soc., 1958, 80, 5735-44.
- 302 - WASSERMAN A.E., HOPKINS W. -
J. Appl. Microbiol, 1958, 6, 49-52.

- 303 - WATTIAUX R., DE DUVE C. -
Biochem. J., 1956, 63, 606.
- 304 - WEIDENHAGEN R. -
Fermentforschung, 1930, 11, 155.
- 305 - WEIDENHAGEN R. -
Ergeb. Enzymforsch, 1932, 1, 168.
- 306 - WEITH L. -
Brauwissenschaft, 1960, 13, 214-18 - 262-7 - 288-94.
- 307 - WICKERMAM L., ANDREASEN A. -
Wallerstein lab. Comm., 1942, 5, 165 - 169.
- 308 - WINGE O., ROBERTS C. -
C.R. Trav. lab. Carlsberg, 1952, 25, 141.
- 309 - WINGE O., ROBERT C. -
Ser. Physiol., 1954, 25, 285.
- 310 - WINGE O., ROBERTS C. -
Heredity, 1954, 8, 295.
- 311 - WINGE O., ROBERTS C. -
In The Chemistry and Biology of yeasts A.H. Cook. Acad. Press,
1958, 137.
- 312 - WOJTASZEK T. -
Zeszyty Nauk Wjzszej Szkoły Rolniezej Krakow, 1960, 7, 63-75.
- 313 - WOOD T.H., ROSENBERG A.M. -
Biochim. Biophys. Acta, 1957, 25, 7887.
- 314 - WYANTS J. -
J. Inst. Brewing, 1962, 68, 350-4.
- 315 - YASUI T., HASHIMOTO Y. -
J. Food Sci., 1966, 31, 293-99.

TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
INTRODUCTION.....	1
RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES.....	3
CHAPITRE I - Généralités sur le lyophilisation....	4
CHAPITRE II - Les levures et leur lyophilisation...	11
CHAPITRE III - Lyophilisation des protéines.....	20
CHAPITRE IV - Lyophilisation des enzymes.....	25
RECHERCHES EXPERIMENTALES	
GENERALITES.....	41
CHAPITRE I - Activité amino transferasique de la levure.....	43
CHAPITRE II - Activité phosphatasique acide.....	49
CHAPITRE III - Activité β h fructofuranosidasique...	54
CHAPITRE IV - Activité leucine aminopeptidasique...	61
CHAPITRE V - Activité I-6 diphosphoaldolasique....	66
CHAPITRE VI - Activité glucose phosphate isomérasi- que.....	72
CHAPITRE VII - Dosage de l'azote total.....	77
CHAPITRE VIII- Dosage des acides ribonucléique et desoxyribonucléique.....	81
CHAPITRE IX - Essai d'interprétation et discussion.	85
RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES.....	90
BIBLIOGRAPHIE	

